(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0160593
(43) 공개일자 2023년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2023.01) *C12Q 1/6841* (2018.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/50273 (2013.01)
C12Q 1/6841 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0060286
(22) 출원일자 2022년05월17일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
강주헌
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
권태준
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

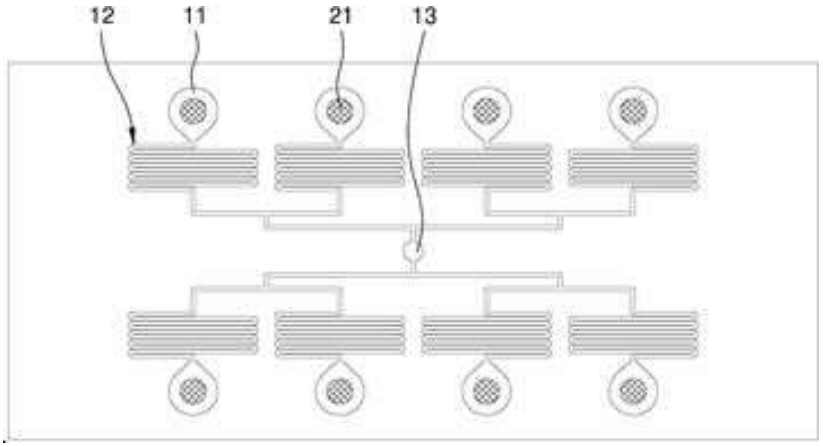
(54) 발명의 명칭 **자성분리를 이용한 정량분석용 미세 유체칩**

(57) 요 약

본 발명은 면역조직화학염색법, 면역형광법 및 FISH(fluorescence in situ hybridization) 등을 수행하기 위한 상부 기판과 시료 내 검출대상 물질의 자성분리를 위한 하부 기판이 상하로 적층되며, 그 사이에 개재된 플레이트를 포함하는 구조의 미세 유체칩(microfluidic chip), 그 제조방법, 상기 미세 유체칩을 이용한 세포 또는 생체분자의 검출 방법에 관한 것이다.

일 양상에 따른 본 발명의 미세 유체칩은 시료 내에 자성입자와 결합된 박테리아 등의 세포를 자성분리하고 FISH 등을 수행함으로써 이를 이미징하거나 시간 별로 정량화 할 수 있으며, 이를 박테리아의 감염 진단의 지표로 활용하거나 항생제 감수성을 예측하는데 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/5304 (2013.01)
B01L 2200/0652 (2013.01)
B01L 2400/043 (2013.01)
C12Q 2565/629 (2013.01)
(72) 발명자
김하진
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이민석
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131016
과제번호	2017M3A9E2062136
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	병원성 미생물의 자기영동 분리 및 FISH 분석을 위한 바이오유체 소자 개발
기 여 율	98/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.06.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345334865
과제번호	5199990614448
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	4단계두뇌한국21사업(R&D)
연구과제명	산업재해 특화 디지털 헬스케어 인재 양성 연구단
기 여 율	2/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

상하로 적층된 상부 및 하부 기판, 상기 상부 및 하부 기판 사이에 개재된 플레이트를 포함하는 미세 유체칩(microfluidic chip)으로서,

상기 상부 기판은 시료 주입부;

배출부; 및

상기 시료 주입부 및 배출부와 연통되는 미세유체 채널을 포함하고,

상기 하부 기판은 그 상면에 시료의 자성분리를 위한 자석이 요입되고, 상기 자석은 상기 시료 주입부의 수직 하단에 대응되도록 배치되는 것인, 미세 유체칩.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시료 주입부, 미세유체 채널 및 자석은 적어도 하나 이상으로 구비되는 것인, 미세 유체칩.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 플레이트는 슬라이드 글라스, 크리스탈 및 커버 글라스로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 미세 유체칩.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 상부 및 하부 기판은 PDMS(poly(dimethylsiloxane)), PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리설폰(Polysulfones), 폴리비닐클로라이트(PVC), 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(D, L-락트산(PDLLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(하이드록시알카노에이트), 폴리다이옥산온(PDS), 폴리트라이메틸렌카보네이트, 폴리(락트산-co-글리콜산)(PLGA) 및 폴리(L-락트산-co-카프로락톤)(PLCL), 폴리(글리콜산-co-카프로락톤)(PGCL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 재질인 것인, 미세 유체칩.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 시료는 자성입자와 상호작용하여 시료 내 검출대상 물질-자성입자의 복합체를 형성하는 것인, 미세 유체칩.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 검출대상 물질은 생체분자, 핵산, 효소, 세포, 단백질, 다당류, 유기물질, 세균, 고균, 진핵생물, 바이러스 및 바이로이드, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 미세 유체칩.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 혈액, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액, 활액, 낭종액(cystic fluid), 복수, 간질액, 및 안구액(ocular fluid)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 미세 유체칩.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 상부 기판은 면역조직화학염색법(immunohistochemistry), 면역형광법(immunofluorescence), 발색 계내 혼성화 또는FISH(fluorescence in situ hybridization)를 수행하기 위한 것인, 미세 유체칩.

청구항 9

고분자 재질의 상부 기판 및 하부 기판을 준비하는 단계;

플레이트를 준비하는 단계;

상기 플레이트를 상기 상부 기판의 하면에 플라즈마 처리하여 부착하는 단계;

자석을 상기 하부 기판의 상면에 돌출없이 요입하는 단계; 및

상기 플레이트가 상기 상부 및 하부 기판 사이에 개재되도록 상부 및 하부 기판을 적층하는 단계를 포함하는, 미세 유체칩의 제조 방법.

청구항 10

검출대상 물질을 포함하는 시료를 준비하는 단계;

상기 시료에 자성입자를 처리하여 검출대상 물질-자성입자 복합체를 형성하는 단계;

상기 복합체가 포함된 시료를 제1항의 미세 유체칩 시료 주입부에 주입하는 단계;

제1항의 미세 유체칩 배출부를 통해 불필요한 시료를 배출하는 단계;

상기 복합체가 포함된 시료에 고정화 및 투과화를 위한 시약을 처리하는 단계;

상기 고정화 및 투과화된 시료에 라벨링 또는 염색을 위한 시약을 처리하는 단계를 포함하는, 세포 또는 생체분자의 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 면역조직화학염색법, 면역형광법 및 FISH(fluorescence in situ hybridization) 등을 수행하기 위한 상부 기판과 시료 내 검출대상 물질의 자성분리를 위한 하부 기판이 상하로 적층되며, 그 사이에 개재된 플레이트를 포함하는 구조의 미세 유체칩(microfluidic chip), 그 제조방법, 상기 미세 유체칩을 이용한 세포 또는 생체분자의 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] FISH(fluorescence in situ hybridization)는 분자세포유전학 검사기법으로서, 염색체의 특정 핵산 서열의 존재 유무를 확인하기 위한 목적으로 형광이 부착되고 특정 핵산 서열에 상보적 결합이 가능한 프로브(probe)을 결합시키는 방식이다. 또한, 세포나 조직에서 특정 단백질의 존재 유무를 확인하기 위한 목적으로 항원-항체 반응을 사용하여 염색하는 면역조직화학염색법(immunohistochemistry), 각종 형광색소가 표지된 항원이나 항체를 사용하는 면역형광법(immunofluorescence) 등도 널리 사용되고 있다.

[0004] 한편, PNA(peptide nucleic acid)는 핵산(DNA, RNA)의 구조와 비슷한 고분자 화학물질로, DNA의 당-인산 backbone을 펩타이드 결합체로 치환하여 DNA와 달리 음전하를 띠지 않는 중성적인 구조를 가진다. 이로 인해 PNA는 DNA 또는 RNA와 달리 상보적 결합을 하는 특정 염기서열에 대해 전기적인 반발이 일어나지 않게 되고, 따라서 보다 더 강한 결합력과 특이성을 갖는다. 또한, 체내의 핵산분해효소와 온도 등에 대해 높은 안정성을 나타내고, 형광표지나 특정 작용기의 결합을 통해 2차 변형이 용이한 장점 등이 있다. 이러한 장점을 바탕으로, PNA는 유전자 진단, 가시적 분자결합화(in situ hybridization), PCR 클램핑(clamping), 플라스미드 벡터 표지법과 같은 다양한 분자생물학적 기술에 활용될 수 있다.

[0005] FISH를 수행함에 있어서, PNA를 프로브로 사용하게 되면 타겟 핵산에 대한 높은 친화성과 특이성 등 특징으로 인해 짧은 혼성화 시간, 낮은 백그라운드 결합, 우수한 재현성 및 시약의 안정성 등의 장점이 있다. 또한, PNA 프로브의 경우 작은 크기로 인해 조직 침투에 효율적이고, 짧은 단일 가닥의 올리고뉴클레오티드이기 때문에 프로브 자체를 변성(denaturation)시킬 필요가 없다.

[0006] 한편, 자성분리(magnetic separation) 기술은 생물학적 분석, 질병의 진단 및 치료 등 다양한 생명공학 분야에서 활용되고 있다. 일반적으로 기존에 알려진 미세유체칩은 대부분 측면 방향의 유체 흐름(lateral flow)을 사용하며, 자석을 칩 바닥면 혹은 측면에 위치시켜 자성나노입자(magnetic nanoparticle)를 분리하는 방법을 사용한다. 그러나 이러한 경우 자성나노입자가 칩 내에 적층되어 자성분리될 수 있고, 이는 입자의 형광 검출과 같은 분석을 수행할 때 정확한 검출을 어렵게 만든다는 문제점이 있었다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 면역조직화학염색법, 면역형광법, FISH 등을 효율적으로 수행하기 위한 미세유체칩으로서, 검출칩과 검출칩의 시료 주입부 아래에 자석이 배치되도록 하는 자성 분리대가 결합된 구조의 미세 유체칩을 완성하였다. 본 발명의 미세 유체칩은 시료 주입부로 주입된 자성나노입자가 측면 방향이 아닌 수직 방향으로 분리되기 때문에, 칩 내에 자성나노입자가 적층되지 않고 칩 바닥면에 균일하게 분포하게 되며, 따라서 더 정확하고 효율적인 FISH 형광 검출 등이 가능하다. 이를 통해 시료 내에 자성나노입자와 결합된 세포 또는 생체분자 등을 자성분리하여 농축된 타겟 샘플을 대상으로 FISH 등을 수행함으로써 타겟 샘플의 검출 효율 및 정확성을 높이고, 나아가 사용된 검출칩만을 교체하여 반복 수행이 가능하게 되므로, 타겟 샘플의 검출에 걸리는 시간도 단축할 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 양상은 상하로 적층된 상부 및 하부 기판, 상기 상부 및 하부 기판 사이에 개재된 플레이트를 포함하는, 미세 유체칩을 제공한다.

[0010] 다른 양상은 고분자 재질의 상부 기판 및 하부 기판을 준비하는 단계;

[0011] 플레이트를 준비하는 단계;

[0012] 상기 플레이트를 상기 상부 기판의 하면에 플라즈마 처리하여 부착하는 단계;

[0013] 자석을 상기 하부 기판의 상면에 돌출없이 요입하는 단계; 및

[0014] 상기 플레이트가 상기 상부 및 하부 기판 사이에 개재되도록 상부 및 하부 기판을 적층하는 단계를 포함하는, 미세 유체칩의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 또 다른 양상은 검출대상 물질을 포함하는 시료를 준비하는 단계;

[0016] 상기 시료에 자성입자를 처리하여 검출대상 물질-자성입자 복합체를 형성하는 단계;

[0017] 상기 복합체가 포함된 시료를 제1항의 미세 유체칩 시료 주입부에 주입하는 단계;

[0018] 제1항의 미세 유체칩 배출부를 통해 불필요한 시료를 배출하는 단계;

[0019] 상기 복합체가 포함된 시료에 고정화 및 투과화를 위한 시약을 처리하는 단계;

[0020] 상기 고정화 및 투과화된 시료에 라벨링 또는 염색을 위한 시약을 처리하는 단계를 포함하는, 세포 또는 생체분자의 검출 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0022] 일 양상은 상하로 적층된 상부 및 하부 기판, 상기 상부 및 하부 기판 사이에 개재된 플레이트를 포함하는 미세유체칩을 제공하는 것이다.

[0023] 본 발명의 미세 유체칩(30)은 자성입자와 결합된 세포 등을 포함하는 시료를 주입부(11)에 주입하고, 불필요한 용액 등을 배출부(13)를 통해 제거 및 시료를 고정화·투과화한 뒤, 자성을 이용하여 자성입자와 결합된 타겟 샘플만을 주입부 바닥으로 분리 및 농축하여 주입부 상에서 면역조직화학염색법(immunohistochemistry), 면역형광법(immunofluorescence), FISH(fluorescence in situ hybridization) 등을 수행함으로써 이를 이미징하거나 정량화하는 것이 가능하다. 또한, 이렇게 정량화된 결과값을 바탕으로 이를 박테리아의 감염 진단의 지표로 활용하거나, 항생제 감수성을 예측하는 데에도 활용할 수 있다.

[0025] 상기 상부 기판(14)은 FISH 등 검출 방법을 수행하기 위한 것으로, 시료 주입부(11) 및 시료가 이동하는 미세유체 채널(12)을 포함할 수 있고, 상기 미세유체 채널을 통해 주입부와 연통되는 하나의 배출부(13)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 주입부(11) 및 미세유체 채널(12)은 적어도 하나 이상으로 구비될 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 당업자가 수행하고자 하는 방법 및 필요에 따라 적절한 수로 구비될 수 있다. 일 실시예에 따르면, 가로 24 ㎜ X 세로 50 ㎜ X 높이 3 ㎜ 크기의 PDMS 칩 상면에 8개의 시료 주입부(11)가 동일한 간격으로 구비될 수 있다.

[0026] 각각의 시료 주입부(11)는 미세유체 채널(12)을 통해 하나의 배출부(13)와 연통될 수 있으며, 일 실시예에 따르면 8개의 시료 주입부가 도 1과 같이 디자인된 미세유체 채널을 통해 배출부와 연통되는 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 명세서에서의 용어 "채널"은 유체(예를 들어, 시료, 시약 및 버퍼 등)가 이동하는 통로를 의미한다. 구체적으로, 평면 흐름 경로를 따라 연장되는 채널(예를 들어, 구불구불하거나 스파이럴(spiral) 평면 패턴의 채널), 비평면 흐름 경로(예를 들어, 나선형의 (helical) 3차원 채널), 또는 미세유체 채널(microfluidic channel)일 수 있으며, 보다 구체적으로는 미세유체 채널을 의미할 수 있다.

[0028] 상기 시료 주입부(11)의 바닥은 하부 기판(22)에 구비된 자석(21)에 의해 자성분리된 타겟 샘플이 농축되며, 각각의 주입부 바닥으로 분리 및 농축된 타겟 샘플에 대해 검출을 수행할 수 있다. 따라서 상기 시료 주입부(11)는 시료 및 FISH 등을 수행하기 위한 시약 등이 담기는 공간이자, 반응 챔버로서 역할을 할 수 있다. 상기 시료 주입부(11)의 직경 및 깊이는 상부 기판(14)의 면적과 높이, 시료 및 시약, 버퍼 등의 주입 용이성 등을 고려하여 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있으며, 일 실시예에서는 직경 3㎜의 시료 주입부를 동일한 간격으로 제작하였다. 한편, 상기 시약은 시료의 고정화, 투과화, 혼성화 및 시료 내 검출대상 물질의 염색 등을 위한 것으로, 시료 및 검출대상 물질의 특성, 당업자의 필요에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0029] 상기 배출부(13)는 자성분리 되지 않은 나머지 시료, 반응하지 않은 시약 및 버퍼 등이 미세유체 채널(12)을 통해 이동하여 배출되는 곳으로, 상기 상부 기판(14)의 중앙에 위치할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니며, 일 실시예에 따르면 시린지 펌프를 이용하여 자성분리 되지 않은 나머지 시료, 반응하지 않은 시약 및 버퍼 등을 상기 배출부를 통해 제거할 수 있다. 배출부를 통해 자성분리 되지 않은 나머지 시료가 배출되고, 주입부를 통해 자성입자와 결합된 세포 등을 포함하는 시료를 지속적으로 주입하면, 다량의 시료에 포함된 타겟 샘플을 효과적으로 수집할 수 있다. 일 실시예에 따르면, 자성입자에 결합된 *E. coli* 시료를 주입부(11)에 주입하고 10분 간 자성분리한 후, 시린지 펌프를 이용하여 10㎕/min의 유속으로 불필요한 용액을 배출부(13)를 통해 배출하였다.

[0030] 상기 상부 기판(14)은 열가소성 수지로서 PDMS(poly(dimethylsiloxane)), PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리설폰(Polysulfones), 폴리비닐클로라이트(PVC), 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(D, L-락트산(PDLLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(하이드록시알카노에이트), 폴리다이옥산온(PDS), 폴리트라이메틸렌카보네이트, 폴리(락트산-co-글리콜산)(PLGA) 및 폴리(L-락트산-co-카프로락톤)(PLCL), 폴리(글리콜산-co-카프로락톤)(PGCL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 재질일 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니며, 광학적 측정 및 이미징(imaging)을

위해 상부 기판의 한쪽 면은 광학적 투명도를 제공하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 상부 기판으로는 PDMS 재질의 칩을 사용할 수 있다.

[0031] 상기 플레이트(15)는 상기 상부 기판(14)의 하면에 부착되어 광학적 측정을 용이하게 하는 것으로, 슬라이드 글라스, 크리스탈 또는 커버 글라스일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 일 실시예에 따르면, 가로 24 mm X 세로 50 mm X 높이 3 mm 크기의 PDMS 칩과 동일한 크기의 커버 글라스(Coverslip)를 플라즈마 처리(80 W, 1 min)하여 상부 기판(14)의 하면에 부착하여 검출칩(10)을 제작하였다.

[0032] 본 명세서에서의 용어 "정량적(Quantitative) 검출칩" 또는 "검출칩"은 상기 상부 기판(14)의 하면에 상기 플레이트(15)가 부착된 구조로서, 면역조직화학염색법, 면역형광법, 발색 계내 혼성화 또는 FISH 등이 수행되는 부분을 의미한다.

[0033] 본 명세서에서의 용어 "PNA FISH"는 전기적 중성을 나타내는 PNA(pentose nucleic acid)를 프로브(probe)으로 활용한 FISH(형광동소보합법)를 의미하는 것으로, in situ 혼성화(hybridization) 시 높은 기질 특이성을 나타내며, 적은 농도의 PNA 프로브만으로도 빠른 혼성화가 가능하여 백그라운드 결합(background binding)을 감소시켜 높은 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio)를 나타내는 등의 장점이 있다.

[0034] 상기 하부 기판(22)은 자성입자와 결합된 타겟 샘플을 분리하기 위한 것으로, 그 상면에 자석(21)이 돌출없이 요입되고, 상기 자석은 상기 시료 주입부(11)의 수직 하단에 대응되도록 배치된다. 일 실시예에 따르면, 상기 상부 기판(14)과 동일한 크기의 PDMS 칩 상면에 구멍(Biopunch, 직경 1mm)을 낸 후, 준비된 원통형 자석(N52, 직경 1.6mm)을 심어 하부 기판(22)을 제작하였다.

[0035] 상기 하부 기판(22)은 PDMS(poly(dimethylsiloxane)), PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리설폰(Polysulfones), 폴리비닐클로라이트(PVC), 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(D, L-락트산(PDLLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(하이드록시알카노에이트), 폴리다이옥산온(PDS), 폴리트라이메틸렌카보네이트, 폴리(락트산-co-글리콜산)(PLGA) 및 폴리(L-락트산-co-카프로락톤)(PLCL), 폴리(글리콜산-co-카프로락톤)(PGCL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 재질일 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니며, 보다 구체적으로는 PDMS 재질의 칩을 사용할 수 있다.

[0036] 본 명세서에서의 용어 "자성 분리대"는 상기 하부 기판(22)의 상면에 자석(21)이 요입된 구조로서, 자성입자와 시료 내 검출대상 물질(생체분자, 핵산, 효소, 세포, 단백질, 다당류, 유기물질, 세균, 고균, 진핵생물, 바이러스 및 바이로이드, 또는 이들의 임의의 조합)이 결합된 복합체를 자성분리하기 위한 부분을 의미한다. 상기 복합체는 특정 박테리아 표면에 특이적으로 나타나는 당 구조체(예들 들어, glycan 등)와 이를 인식하는 면역단백질이 코팅된 자성입자 간의 결합, 또는 박테리아와 자성입자의 정전기적 특성에 의해 형성되는 것일 수 있으나, 상기 복합체를 형성하는 방식 또는 원리가 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 명세서에서의 용어 "시료"는 생체 시료일 수 있으며, 구체적으로 개체(사람을 포함하는 포유동물)로부터 단리된 체액(예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 객담 또는 소변), 기관, 조직, 분획, 또는 세포일 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 상기 시료는 개체로부터 분리된 혈액, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액, 활액, 낭종액(cystic fluid), 복수, 간질액, 및 안구액(ocular fluid)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 세포 또는 생체분자 등 검출대상 물질을 포함하고 있을 수 있다. 일 실시예에 따르면, ESBL (+)-*E. coli*에 감염된 돼지 감염모델로부터 채취한 혈액을 시료로 FISH를 수행하였다.

[0038] 본 명세서에서의 용어 "자성입자(magnetic particles, 자성비드)"는 자성을 가지고 있고, 시료 내 검출대상 물질(세포 또는 생체분자 등)과 결합할 수 있는 입자이면 어느 것이나 포함될 수 있으며, 예를 들어 옵소닌화된 박테리아에 결합할 수 있는 자성입자, 특정 박테리아에 결합하는 면역 단백질이 코팅된 자성입자도 이에 포함된다. 또한, 본 명세서에서 상기 "자성입자"는 용어 "자성나노입자"와 혼용될 수 있다. 구체적으로, 상기 자성 입자는 철(Fe), 니켈(Ni), 코발트(Co), 망간(Mn), 비스무스(Bi), 아연(Zn), 스트론튬(Sr), 란타넘(La), 세륨(Ce), 프라세오디뮴(Pr), 네오디뮴(Nd), 프로메튬(Pm), 사마륨(Sm), 유로퓸(Eu), 가돌리늄(Gd), 테르븀(Tb), 디스프로슘(Dy), 홀뮴(Ho), 에르븀(Er), 툴륨(Tm), 이테르븀(Yb), 루테늄(Lu), 구리(Cu), 은(Ag), 금(Au), 카드뮴(Cd), 수은(Hg), 알루미늄(Al), 갈륨(Ga), 인듐(In), 탈륨(Tl), 칼슘(Ca), 바륨(Ba), 라듐(Ra), 백금(Pt), 및 납(Pd)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 자성 원소를 포함할 수 있다. 또한, 상기 자성 입자는 공지된 방법을 통해 제조해서 사용할 수 있고, 상업적으로 구입해서 사용할 수도 있다.

[0040] 다른 양상은 고분자 재질의 상부 기판 및 하부 기판을 준비하는 단계; 플레이트를 준비하는 단계; 상기 플레이트를 상기 상부 기판의 하면에 플라즈마 처리하여 부착시키는 단계; 자석을 상기 하부 기판의 상면에 돌출없이 요입시키는 단계; 및 상기 플레이트가 상기 상부 및 하부 기판 사이에 개재되도록 상부 및 하부 기판을 적층하는 단계를 포함하는, 미세 유체칩의 제조 방법을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 제조 방법에도 공히 적용된다.

[0041] 본 발명의 미세 유체칩(30)은 상기 검출칩(10)과 자성 분리대(20)가 위 아래로 포개어진 구조로, 상기 자성 분리대의 자석(21)이 플레이트(15)를 사이에 두고 검출칩의 각 주입부(11) 아래에 위치하게 되고, 주입부에 시료를 주입하면 자성입자와 결합된 세포 등을 주입부 바닥에 분리 및 농축한 상태로 검출을 수행할 수 있는 바, 타겟 샘플의 검출 효율 및 정확성을 높일 수 있다.

[0042] 또한, 특정 시료에 대해 FISH 등을 수행한 후, 자성 분리대(20)는 그대로 두고 검출칩(10)만 교체하여 다시 자성 분리대 위에 적층함으로써 보다 신속하게 다른 시료에 대해 검출을 수행할 수 있으며, 이에 동일하거나 상이한 시료에 대해 반복적으로 타겟 샘플의 검출이 필요한 경우 소요되는 시간을 획기적으로 단축할 수 있는 장점이 있다.

[0044] 또 다른 양상은 검출대상 물질을 포함하는 시료를 준비하는 단계; 상기 시료에 자성입자를 처리하여 검출대상 물질-자성입자 복합체를 형성시키는 단계; 상기 복합체가 포함된 시료를 제1항의 미세 유체칩 시료 주입부에 주입하는 단계; 제1항의 미세 유체칩 배출부를 통해 불필요한 시료를 배출시키는 단계; 상기 복합체가 포함된 시료에 고정화 및 투과화를 위한 시약을 처리하는 단계; 상기 고정화 및 투과화된 시료에 라벨링 또는 염색을 위한 시약을 처리하는 단계를 포함하는, 세포 또는 생체분자의 검출 방법을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 검출 방법에도 공히 적용된다.

[0045] 상기 라벨링(labeling)은 광학적 표지, 전기적 표지, 방사능 표지, 효소 표지 또는 그 조합을 이용하여 수행될 수 있으며, 구체적으로는 광학적 표지를 이용한 형광 라벨링일 수 있다. 상기 광학적 표지는 형광 또는 인광을 발생시키는 물질로서, 형광을 발생시키는 물질로는 예를 들면, 플루오레세인(fluorescein), 로다민, 시아닌, 금속 포르피린 복합체, Cy-5 또는 Cy-3일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0046] 또한, 상기 염색은 세포핵 염색을 위한 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole), 메틸렌블루(methylene blue), 아세트산카민(acetocarmine), 톨루이딘블루(toluidine blue), 헤마톡실린(hematoxylin), 획스트(Hoechst) 또는 이들의 임의의 조합일 수 있으며, 세포질 염색을 위한 에오신(eosin), 크리스탈바이올렛(crystal violet), 오렌지 G(orange G) 또는 이들의 임의의 조합일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0048] 일 양상에 따른 본 발명의 미세 유체칩은 시료 내에 자성입자와 결합된 박테리아 등의 세포를 자성분리하고 FISH 등을 수행함으로써 이를 이미징하거나 시간 별로 정량화 할 수 있으며, 이를 박테리아의 감염 진단의 지표로 활용하거나 항생제 감수성을 예측하는데 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 일 양상에 따른 미세 유체칩의 평면도를 나타낸 것이다.

도 2는 일 양상에 따른 본 발명 검출칩의 사시도를 나타낸 것이다.

도 3은 일 양상에 따른 본 발명 자성 분리대의 사시도를 나타낸 것이다.

도 4는 일 양상에 따른 본 발명 미세 유체칩의 측면도를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 검출칩과 자성 분리대가 위 아래로 포개어진 구조의 미세 유체칩을 나타낸 것이다.

도 6은 자성비드에 결합된 *E. coli* 샘플을 이용한 FISH 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 ESBL(+)-*E. coli* 에 감염된 돼지 감염모델에서 감염시간에 따른 돼지 혈액 내 Bacterial(Universal

bacteria 및 *E. coli*) FISH count의 변화를 나타낸 것이다.

도 8은 *E. coli* 감염 환자(Infected)와 비감염 대조군(Non-infected)의 혈액 내 *E. coli* FISH count를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 패혈증 환자의 항생제 처리 전/후 혈액 내 Universal bacteria 및 *E. coli* FISH count 변화를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] **실시예 1: 정량적(Quantitative) 검출칩 제작**

[0054] 본 발명의 장치는 적어도 1개 이상의 샘플 주입부(Inlet, 직경 3mm), 1개의 배출부(Outlet) 및 이를 서로 연결하는 미세 유체채널을 포함하는 검출칩과 각 샘플 주입부의 수직 하단에 대응되도록 자석이 배치된 자성분리대를 포함하는 구조로서, 먼저 도 1과 같이 디자인된 PDMS 칩을 가로 24 mm X 세로 50 mm X 높이 3 mm 크기로 제작하였으며, 플라즈마 처리(80 W, 1 min)를 통해 PDMS 칩과 동일한 크기의 커버 글라스(Coverslip)를 PDMS 칩 하부에 부착시켜 검출칩을 제작하였다(도 2).

[0056] **실시예 2: 자성분리대 및 미세 유체칩 제작**

[0057] 실시예 1의 검출칩 상에 있는 주입부 각각의 수직 하단에 대응되는 위치에 원통형 자석(Cylindrical magnet)을 배치시키기 위해, 상기 검출칩과 동일한 크기의 PDMS 칩 상에 상기 주입부와 대응되는 위치에 구멍(Biopunch, 직경 1mm)을 낸 후, 준비된 원통형 자석(N52, 직경 1.6mm)을 심어 자성분리대를 제작하였다(도 3). 이후 상기 자성분리대 위에 실시예 1의 검출칩이 포개어지도록 위치시켜 최종적으로 미세 유체칩을 완성하였다(도 4 및 도 5).

[0059] **실시예 3: *E. coli*를 이용한 FISH 수행**

[0060] 자성입자에 결합된 *E. coli*(K-12 W3110, Korean Collection for Type Culture (KCTC) 2223)를 샘플로 준비하여 FISH를 진행하였다. 먼저 주입부(Inlet well)에 *E. coli* 샘플을 주입하고 10분 간 자성분리한 후, 시린지 펌프를 이용하여 10㎕/min의 유속으로 불필요한 용액을 배출부(Outlet)를 통해 배출하였다. 이후 샘플의 고정화 및 투과화를 위해 24%(v/v) 에탄올 in 1X TBST with 5 mM $CaCl_2$ (5분), 1X TBST with 5 mM $CaCl_2$ (3분), 99% 메탄올(5분), 1X TBST with 5 mM $CaCl_2$ (3분) 순으로 시약을 처리하였다. 샘플의 형광 프로브 혼성화(hybridization)를 위해 혼성화 용액(hybridization solution, 1μM) 내 *E. coli* PNA FISH 프로브(5'-CTTTACTCCCTTCCT-3')를 45℃ 온도에서 1시간 동안 처리하였다. 또한, 세포의 핵 염색(Counterstaining)을 위해 DAPI(10 ㎍/mL in 2X SSC)을 상온에서 30분 간 처리한 후, 2X SSC 버퍼를 이용하여 워싱 및 형광현미경을 통해 이미징을 진행하였다.

[0061] 그 결과, 자성입자에 결합된 *E. coli*에 *E. coli* PNA FISH 프로브가 성공적으로 바인딩되어 형광 검출되는 것을 확인하였다(도 6).

[0063] **실시예 4: 돼지 감염모델을 이용한 FISH 수행**

[0064] ESBL(+)-*E. coli*에 감염된 돼지 감염모델(n = 7) 을 이용하여 혈액 내 *E. coli* 양을 정량화 하였다. 동맥에 연결된 카테터를 통해 대조군(CTL)의 혈액 샘플을 채취하고, *E. coli*(10^{10} CFU per one porcine model)를 혈관에 주입 후, 1시간 간격(0 h ~ 11 h)으로 채혈을 진행하였다. 감염 1시간 째(1 h) 채혈 직후 항생제 세프트리악손(Ceftriaxone)을 투여하였으며, 실험에 사용된 ESBL (+)-*E. coli*는 이에 내성을 보이는 것으로 알려져있다. 시간 별 채혈된 혈액 샘플(DNA/RNA ShieldTM blood collection tube; R1150, Zymo Research, CA, USA)에 *E.*

*coli*에 결합하는 면역 단백질(Human recombinant mannose binding lectin; 10405-HNAS, Sino Biological, China)이 코팅된 자성비드(직경 200nm; 03121, Ademtech, France)를 처리하여 혈액 내 *E. coli*만을 자성 분리 및 농축된 샘플을 준비하였으며, 이후 제작된 미세유체칩을 이용하여 샘플 내 *E. coli*의 정량화를 진행하였다.

[0065] 그 결과, 돼지 감염모델의 혈액 내 박테리아 총량(Universal bacteria)과 *E. coli*의 양을 시간별로 정량화할 수 있었고(도 7), 감염 8시간 째까지 혈액 내 박테리아의 FISH count 수치가 감소하지 않는 것을 확인하였으며, 이로부터 감염 상태가 회복되지 않고 있는 것으로 추측할 수 있었다.

[0067] **실시예 5: 감염 환자 혈액을 이용한 FISH**

[0068] **실시예 5-1: Quantitative FISH을 이용한 *E. coli* 감염 진단**

[0069] *E. coli* 감염 환자(혈액, 소변, 가래 및 담즙 등의 검체에서 *E. coli*가 배양된 경우)의 혈액 샘플과 비감염 대조군의 혈액 샘플을 이용하여 FISH 정량화 비교를 진행하였다. 그 결과, 대조군과 비교하였을 때 *E. coli* 감염 환자의 혈액에서 더 높은 *E. coli* FISH 신호가 검출되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명을 활용한 결과가 박테리아 감염의 진단 지표로 활용 가능하다는 것을 증명하였다(도 8).

[0070] **실시예 5-2: Quantitative FISH을 이용한 항생제 감수성 예측**

[0071] 항생제 처리에 따른 패혈증 환자의 혈액 내 박테리아 FISH count의 변화를 통해 항생제 감수성을 예측하고자 하였다. 그 결과, 항생제 처리에 의해 혈액 내 박테리아 FISH count가 크게 변화(증가 또는 감소)하는 경우(#46, 47, 50, 51, 54, 58, 59, 64, 65, 70, 71)와 변화하지 않는 경우의 환자(#44, 52, 55, 56, 57, 60, 62, 68)로 분류되었으며, 이를 통해 항생제 처리 전/후에 따른 FISH count 변화 정도로부터 항생제 감수성을 예측할 수 있을 것으로 확인하였다(도 9).

[0073] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

부호의 설명

[0075] 10: 검출칩

11: 시료 주입부

12: 미세유체 채널

13: 배출부

14: 상부 기판

15: 플레이트

20: 자성 분리대

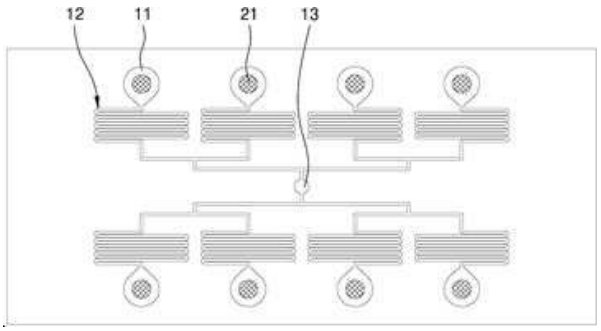
21: 자석

22: 하부 기판

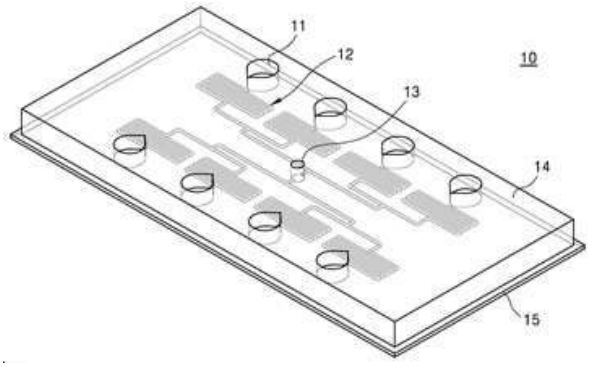
30: 미세 유체칩

도면

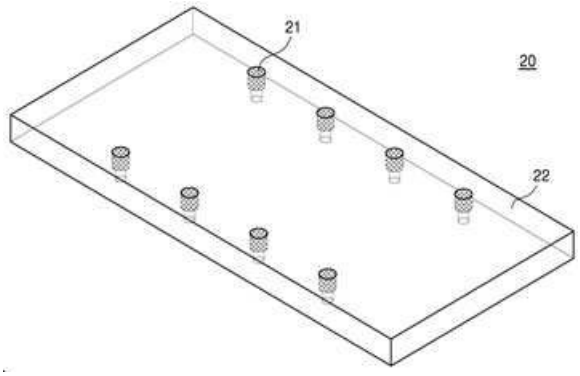
도면1



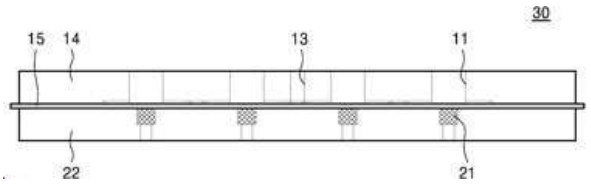
도면2



도면3



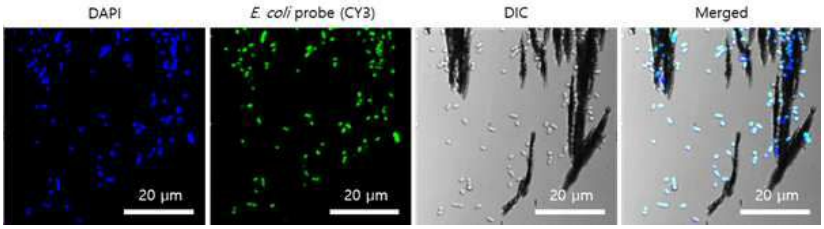
도면4



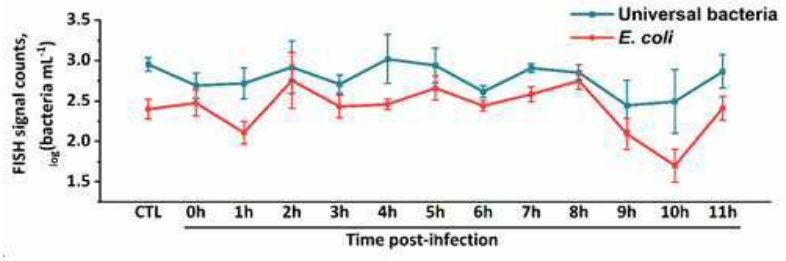
도면5



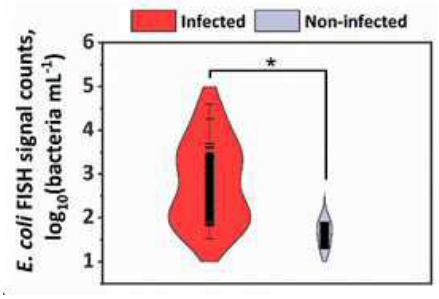
도면6



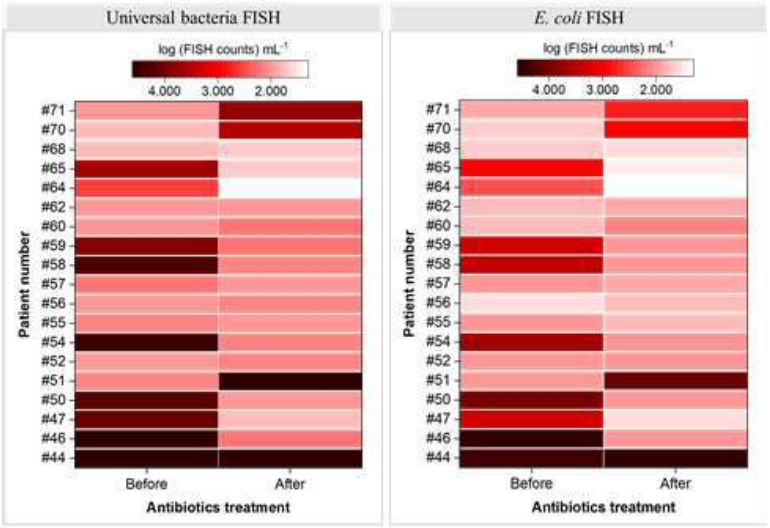
도면7



도면8



도면9


Universal bacteria FISH
log (FISH counts) mL-1
4.000 3.000 2.000
Patient number
#71 #70 #68 #65 #64 #62 #60 #59 #58 #57 #56 #55 #54 #52 #51 #50 #47 #46 #44
Before
After
Antibiotics treatment
E. coli FISH
log (FISH counts) mL-1
4.000 3.000 2.000
Patient number
#71 #70 #68 #65 #64 #62 #60 #59 #58 #57 #56 #55 #54 #52 #51 #50 #47 #46 #44
Before
After
Antibiotics treatment