



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0010102
(43) 공개일자 2019년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
G01N 35/00 (2006.01) G01N 35/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/502746 (2013.01)
B01L 3/502761 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0092386
(22) 출원일자 2017년07월21일
심사청구일자 2017년07월21일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정봉근
경기도 과천시 관문로 143 (중앙동, 래미안 에코
팰리스아파트) 1110동 1004호
문주윤
경기도 하남시 하남대로802번길 111 306동 1903호
(신장동, 에코타운3단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
지현조

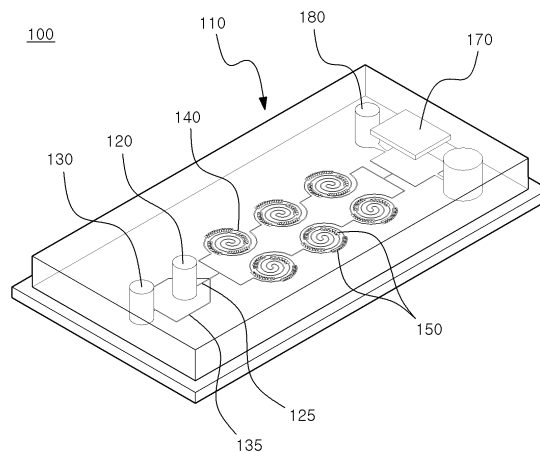
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 무세포 유전물질(cell free tumor DNA)을 검출하기 위한 미세유체장치 및 검출방법

(57) 요약

미세유체장치는 무세포 유전물질을 포함하는 제1 시료가 유입되는 제1 유입구, 미세 자성 비드를 포함하는 제2 시료가 유입되는 제2 유입구, 제1 유입구와 제2 유입구로부터 유입된 제1 및 제2 시료가 혼합 시료를 이루며 통과하며 적어도 일 지점에서 변곡되는 곡선 채널, 곡선 채널 상에 형성되며 복수의 미세 필라가 형성된 적어도 하나의 미세 필라 섹터, 및 제1 및 제2 유입구에 대향하여 곡선 채널이 타단에 연결되어 곡선 채널을 통과한 혼합 시료로부터 미세 자성 비드를 수집하는 자성 수집부를 구비하며, 상기 곡선 채널을 통과하면서 혼합 시료 내에서는 원심력 또는 구심력 방향으로 이동이 발생하여 제1 혼합이 진행되고, 미세 필라 섹터를 통과하면서 미세 필라에 의해서 혼합 시료의 제2 혼합이 진행되며, 곡선 채널 중 변곡되는 지점을 통과하면서 제1 혼합의 방향이 역전될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/1013 (2013.01)
G01N 35/0098 (2013.01)
G01N 35/085 (2013.01)
B01L 2200/0652 (2013.01)
B01L 2300/0883 (2013.01)
B01L 2400/086 (2013.01)

김태현

서울특별시 노원구 동일로180길 47-9 지하1층 (공릉동, 청화주택)

(72) 발명자

계현기

서울특별시 마포구 백범로 35 (대흥동, 서강대학교)

아흐메트그크리스티안다니엘

서울특별시 마포구 백범로 35 (대흥동, 서강대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A15054236
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견도약 성과확산사업
 연구과제명 기능성 나노재료와 Organ-on-a-Chip 기술을 이용한 뇌종양 진단 및 치료기술 개발
 기 여 율 30/100
 주관기관 서강대학교
 연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3A9D7030461
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오의료기술개발사업
 연구과제명 Dark Matter 진단을 위한 일체형 미세유체 진단 플랫폼 기술개발
 기 여 율 40/100
 주관기관 서강대학교
 연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013K1A4A3055268
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 해외우수연구기관유치사업
 연구과제명 서강-하버드 바이오펠리 연구센터
 기 여 율 30/100
 주관기관 서강대학교
 연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

무세포 유전물질을 포함하는 제1 시료가 유입되는 제1 유입구;

미세 자성 비드를 포함하는 제2 시료가 유입되는 제2 유입구;

상기 제1 유입구 및 상기 제2 유입구로부터 유입된 상기 제1 및 제2 시료가 혼합 시료를 이루며 통과하며, 적어도 일 지점에서 변곡되는 곡선 채널;

상기 곡선 채널 상에 형성되며 복수의 미세 필라가 형성된 적어도 하나의 미세 필라 섹터; 및

상기 제1 및 제2 유입구에 대하여 상기 곡선 채널이 타단에 연결되어 상기 곡선 채널을 통과한 상기 혼합 시료로부터 상기 미세 자성 비드를 수집하는 자성 수집부;를 구비하며,

상기 곡선 채널을 통과하면서 상기 혼합 시료 내에서는 원심력 또는 구심력 방향으로 이동이 발생하여 제1 혼합이 진행되고, 상기 미세 필라 섹터를 통과하면서 상기 미세 필라에 의해서 상기 혼합 시료의 제2 혼합이 진행되며, 상기 곡선 채널 중 변곡되는 지점을 통과하면서 상기 제1 혼합의 방향이 역전되는 것을 특징으로 하는 미세 유체장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 곡선 채널이 시작되는 영역에서 상기 미세 자성 비드는 원심력 방향으로 치우친 상태로 상기 곡선 채널에 유입되도록 설계된 것을 특징으로 하는 미세유체장치.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제1 유입구와 상기 곡선 채널의 입구를 연결하는 제1 유입 채널, 및 상기 제2 유입구와 상기 곡선 채널의 상기 입구를 적어도 2개 이상의 유로로 연결하며, 상기 제2 유입 채널을 중심으로 주변으로부터 상기 곡선 채널의 상기 입구로 연결되는 제2 유입 채널을 포함하고,

상기 곡선 채널도 2개 이상의 유로를 형성하며 분리되어 상기 자성 수집부로 연결되며,

분리된 상기 곡선 채널의 상기 시작 영역에서 상기 미세 자성 비드를 포함하는 흐름이 원심력 방향으로 치우친 것을 특징으로 하는 미세유체장치.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 미세 필라 섹터는 상호 교번적으로 형성된 제1 미세 필라 및 제2 미세 필라를 포함하며, 상기 제1 및 제2 미세 필라는 상기 혼합 시료의 흐름 방향에 대해 예각 또는 직각을 형성하며 배치되는 것을 특징으로 하는 미세 유체장치.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 제1 및 제2 미세 필라는 상기 혼합 시료의 흐름 방향에 대해 좌우 비대칭으로 형성되는 것을 특징으로 하는 미세유체장치.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 제1 미세 필라는 상기 제2 미세 필라에 비해 상대적으로 짧은 길이로 형성되며, 상기 제1 미세 필라는 상기 미세 자성 비드를 주로 포함하는 흐름에 대응하여 최초 변곡되는 지점 이전에는 원심력 방향으로 치우치는 바깥쪽 영역에 형성되고, 상기 최초 변곡되는 지점 이후에는 안쪽 영역에 형성되는 것을 특징으로 하는 미세유체장치.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 제1 미세 필라 및 제2 미세 필라의 위치는 변곡되는 지점을 통과하면서 역전되는 것을 특징으로 하는 미세유체장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 곡선 채널은 나선형으로 형성되며, 상기 혼합시료를 바깥쪽에서 안쪽으로 안내하는 제1 나선부, 상기 혼합시료를 안쪽에서 바깥쪽으로 안내하는 제2 나선부, 및 상기 제1 나선부와 상기 제2 나선부를 중심에서 연결하는 변곡부를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 곡선 채널은 지그재그형으로 형성되는 것을 특징으로 하는 미세유체장치.

청구항 10

무세포 유전물질을 포함하는 제1 시료 및 미세 자성 비드를 포함하는 제2 시료가 혼합된 혼합 시료를 적어도 일 지점에서 변곡되는 곡선 채널로 공급하는 단계;

상기 곡선 채널 상에 복수의 미세 필라가 형성된 적어도 하나의 미세 필라 섹터를 형성하여 상기 혼합 시료가 상기 미세 필라 섹터를 통과하도록 유도하는 단계; 및

상기 곡선 채널의 출구에 자성 수집부를 형성하여 상기 곡선 채널을 통과한 상기 혼합 시료로부터 상기 미세 자성 비드를 수집하는 단계;를 구비하며,

상기 곡선 채널을 통과하면서 상기 혼합 시료 내에서는 원심력 또는 구심력 방향으로 이동이 발생하여 제1 혼합이 진행되고, 상기 미세 필라 섹터를 통과하면서 상기 미세 필라에 의해서 상기 혼합 시료의 제2 혼합이 진행되며, 상기 곡선 채널 중 변곡되는 지점을 통과하면서 상기 제1 혼합의 방향이 역전되는 것을 특징으로 하는 미세유체장치를 이용한 검출방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 곡선 채널이 시작되는 영역에서 상기 미세 자성 비드가 원심력 방향으로 치우친 바깥쪽 영역으로 유입되도록 시키는 것을 특징으로 하는 미세유체장치를 이용한 검출방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 곡선 채널의 상기 입구에서 상기 제1 시료를 중심으로 상기 제2 시료를 주변으로부터 유입시키고, 상기 곡선 채널도 2개 이상의 유로를 형성하며 분리되어 상기 자성 수집부로 연결되도록 하며,

분리된 상기 곡선 채널의 상기 시작 영역에서 상기 미세 자성 비드를 포함하는 흐름이 원심력 방향으로 치우치도록 유입시키는 것을 특징으로 하는 미세유체장치를 이용한 검출방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 미세 필라 섹터에는 상호 교번적으로 제1 미세 필라 및 제2 미세 필라를 형성하고, 상기 제1 및 제2 미세 필라는 상기 혼합 시료의 흐름 방향에 대해 예각 또는 직각을 형성하도록 배치하는 것을 특징으로 하는 미세유체장치를 이용한 검출방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 제1 및 제2 미세 필라는 상기 혼합 시료의 흐름 방향에 대해 좌우 비대칭으로 형성되는 것을 특징으로 하는 미세유체장치를 이용한 검출방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 제1 미세 필라 및 제2 미세 필라의 위치를 변곡되는 지점을 중심으로 서로 반대로 배치하는 것을 특징으로 하는 미세유체장치를 이용한 검출방법.

청구항 16

제10항에 있어서,

상기 곡선 채널을 나선형으로 형성하며, 상기 혼합시료를 바깥쪽에서 안쪽으로 안내하는 제1 나선부, 상기 혼합시료를 안쪽에서 바깥쪽으로 안내하는 제2 나선부, 및 상기 제1 나선부와 상기 제2 나선부를 중심에서 연결하는 변곡부를 포함하도록 상기 곡선 채널을 형성하는 것을 특징으로 하는 미세유체장치를 이용한 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 무세포 유전물질(cfDNA)을 검출하기 위한 방법으로서, 보다 자세하게는, 혈장으로부터 분리된 cfDNA와 자성 비드를 효과적으로 혼합하기 위한 미세유체장치 및 이를 이용한 cfDNA 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유방암 등의 암을 모니터링하기 위한 방법으로 액체 생검이 있으며, 액체 생검은 혈액의 혈장 내에 포함된 무세포 암 DNA(cell free tumor DNA)를 검출하는 방법을 통해서 실행될 수 있다. 액체 생검은 조직 생검으로는 확인할 수 없는 종양을 확인할 수도 있다는 점에서 의학적으로 많은 관심을 받고 있다. cfDNA는 순환하는 혈장, 소변 또는 인간의 다른 체액을 통해 검출될 수 있다. cfDNA를 이용한 활용방법 중 하나로 공개특허 제10-2017-004904호에는 cfDNA의 세포 유형을 결정하고 확인하는 방법이 개시되어 있다.

[0003] 일반적으로, cfDNA는 혈장 내에서 소낭에 둘러싸인 상태로 제공되며, 히팅과 버퍼를 이용하여 주변 온도를 약 50~65℃까지 올리고 단백질을 녹임으로써 소낭 내의 cfDNA를 추출할 수가 있다. 버퍼로는 프로테아제(Protease) 및 화학 변성제(Denaturing agent)를 포함하는 것을 사용할 수 있으며, 히팅 온도로는 약 50~65℃까지 올림으로써, 혈장 안의 다양한 혈장단백질들과 함께 엑소솜이라는 미세 소낭의 막을 제거할 수 있다. 미세 소낭 안에는 cfDNA가 존재하므로, 미세소낭의 막을 없애 cfDNA를 추출하고 단백질 불순물들을 제거하여 검출농도와 순도를 높일 수 있다.

[0004] 분리된 cfDNA는 극성을 가지기 때문에, 특정 극성으로 물리는 특성을 가지며, 이러한 특성을 이용한 미세 자성 비드(beads)와 혼합하여 cfDNA를 선택적으로 분리시킬 수 있다. 자기장 내에서 자성 비드와 함께 cfDNA를 검출할 수가 있다.

[0005] 종래의 방법에 따르면, cfDNA를 검출하기 위해서 외부동력을 이용하거나 3D 구조를 바탕으로 혼합을 하기 때문에 제작과정에 있어서 어려움이 따른다. 외부동력을 이용하는 경우 cfDNA를 검출하기 위한 시간적, 공간적 제한을 수반하게 되며 그에 따라 소요되는 시간도 함께 증가하게 된다. 3D 구조를 이용하는 경우에도 마이크로 단위의 패턴이 새겨진 칩 위에 다른 칩을 배치한다는 것도 제작이 용이하지 않고 핸드 튜닝을 이용한 경우 균일한 능률을 기대하기 힘들다는 단점이 있다.

[0006] 즉, cfDNA의 추출을 위해서 자성 비드들과 혼합을 하게 되는데 기존 기술을 살펴보면 능동 혼합, 수동 혼합이 존재한다. 능동 혼합은 외부 동력을 이용하고, 수동 혼합은 3D 구조를 이용하여 혼합을 한다. MEMS 공정을 이용하여 3D구조물을 만들 경우 에칭(Etching)과정이 포함되거나, 멀티 레이어(Multi-layer) 구조를 만들어야 하기 때문에 제작과정이 쉽지 않다. 또한 대부분의 기술들은 액체-액체 간의 혼합, 비드(Beads)-액체의 분리에 대한 연구가 주를 이루고 있다.

[0007] cfDNA를 검출하기 위해서, 종래에는 원심분리기, 오븐, 교반기 같은 실험실 단위의 기기들이 필요하였고, 그만큼 cfDNA를 검출하기까지의 시간이 길다는 단점을 가지고 있다. 최근에는 이러한 단점을 극복하고자 미세유체칩 기술을 이용하여 cfDNA를 검출하는 기술들이 개발되고 있다.

[0008] 하지만, 종래의 cfDNA 검출 기술들은 그대로 미세유체 칩에 적용되기 어렵다. 왜냐하면, 일반적으로 미세 채널 내에서는 층류(laminar flow)가 형성되기 때문에, 미세유체 칩 내에서 적은 량의 자성 비드와 cfDNA가 서로 혼합시키는 것이 쉽지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 외부 동력과 같은 추가 장비 없이 미세유체장치를 이용하여 혈장으로부터 cfDNA를 효과적으로 검출할 수 있는 미세유체장치 및 검출방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 미세유체장치 내에서도 자성 비드와 cfDNA의 혼합 효율을 높이고 빠르게 혼합시킬 수 있는 미세유체장치 및 검출방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상술한 본 발명의 목적들을 달성하기 위한 본 발명의 예시적인 일 실시예에 따르면, 미세유체장치는 무세포 유전물질을 포함하는 제1 시료가 유입되는 제1 유입구, 미세 자성 비드를 포함하는 제2 시료가 유입되는 제2 유입구, 제1 유입구와 제2 유입구로부터 유입된 제1 및 제2 시료가 혼합 시료를 이루며 통과하며 적어도 일 지점에서 변곡되는 곡선 채널, 곡선 채널 상에 형성되며 복수의 미세 필라가 형성된 적어도 하나의 미세 필라 섹터, 및 제1 및 제2 유입구에 대향하여 곡선 채널이 타단에 연결되어 곡선 채널을 통과한 혼합 시료로부터 미세 자성 비드를 수집하는 자성 수집부를 구비하며, 상기 곡선 채널을 통과하면서 혼합 시료 내에서는 원심력 또는 구심력 방향으로 이동이 발생하여 제1 혼합이 진행되고, 미세 필라 섹터를 통과하면서 미세 필라에 의해서 혼합 시료의 제2 혼합이 진행되며, 곡선 채널 중 변곡되는 지점을 통과하면서 제1 혼합의 방향이 역전될 수 있다.

[0012] 본 실시예에 따르면 2 종류의 혼합이 동시에 또는 반복적으로 진행된다. 제1 혼합은 혼합 시료가 곡선의 채널을 통과하면서 회전 중심을 기준으로 곡선 채널의 안쪽과 바깥쪽 영역에서 유속의 차이가 발생하게 되고, 혼합 시료에는 원심력 또는 구심력이 발생하게 됨으로써, 반경에 따라 압력의 구배가 발생하여 원심력 또는 구심력 방향으로, 예를 들어 혼합 시료의 흐름이 종방향이라면 횡방향으로 또는 상하 방향으로 된 유동이라는 시료의 추가 이동이 발생할 수 있다. 이에 따라 cfDNA 및 미세 자성 비드 간의 혼합이 추가로 발생할 수 있으며, 상호 혼합이 더 활성화될 수 있다.

[0013] 또한, 제2 혼합은 혼합 시료가 미세 필라 섹터를 통과하면서 발생할 수 있다. 미세 필라 섹터를 이용하여 채널의 폭을 일시적으로 증가시킴으로써 와동(vortex)을 발생시킬 수 있으며, 채널의 폭이 넓어지게 되면 유체 속의 입자는 항력에 의해 가속되며 와동을 형성할 수 있다.

[0014] 미세 필라는 섹터 내에서 혼합 시료의 직선 흐름을 방해할 수 있으며, 인위적인 흐름을 형성하여 미세 필라 섹터를 통과하는 혼합 시료의 흐름이 분리되고 굽이치며, 서로 부딪히도록 설계될 수 있다.

[0015] 이를 위해서, 미세 필라 섹터는 상호 교번적으로 형성된 제1 미세 필라 및 제2 미세 필라를 포함할 수 있으며, 제1 및 제2 미세 필라는 혼합 시료의 흐름 방향에 대해 예각 또는 직각을 형성하며 되도록 혼합 시료의 주된 흐름을 유지하되 흐름이 정체되거나 거스르지 않게 할 수가 있다.

[0016] 미세 필라 섹터가 곡선 채널 상에 형성되기 때문에, 제1 및 제2 미세 필라도 혼합 시료의 흐름 방향에 대해 좌우 비대칭으로 형성될 수가 있다. 예를 들어, 제1 미세 필라는 제2 미세 필라에 비해 상대적으로 짧은 길이로 형성될 수 있다. 곡선 채널 내에서도 미세 자성 비드를 주로 포함하는 흐름과 cfDNA를 주로 포함하는 흐름이 서로 층류(laminar flow)를 형성하며 미세 채널 내에서 거의 섞이지 않기 때문에, 바람직하게는 상대적으로 짧은

제1 미세 필라가 미세 자성 비드를 주로 포함하는 흐름에 대응하도록 위치하는 것이 좋다. 구체적으로 제1 미세 필라가 최초 변곡되는 지점 이전에는 원심력 방향으로 치우치는 바깥쪽 영역에 형성되고, 최초 변곡되는 지점 이후에는 안쪽 영역에 형성되도록 할 수 있다. 또한, 변곡되는 지점이 더 추가되는 경우는 역시 제1 미세 필라 및 제2 미세 필라의 위치를 서로 반대로 위치시킬 수도 있다.

[0017] 즉, 제1 미세 필라와 제2 미세 필라를 비대칭으로 형성하는 경우, 제1 미세 필라 및 제2 미세 필라의 위치는 변곡되는 지점을 통과하면서 역전되도록 설계할 수 있으며, 변곡되는 지점을 중심으로 제1 미세 필라와 제2 미세 필라가 서로 반대되는 위치에 배치되도록 할 수가 있다.

[0018] 또한, 곡선 채널이 시작되는 영역에서 상기 미세 자성 비드는 원심력 방향으로 치우친 상태로 곡선 채널에 유입되도록 설계될 수 있다. 일 예로, 제1 유입구와 곡선 채널의 입구를 연결하는 제1 유입 채널 및 제2 유입구와 곡선 채널의 입구를 연결하는 제2 유입 채널을 형성함에 있어서, 제2 유입 채널을 적어도 2개 이상으로 분기하여 2개 이상의 유로로 연결하도록 할 수 있으며, 곡선 채널의 입구에서 제1 유입 채널과 만나게 할 때에도 제1 유입 채널을 중심으로 제2 유입 채널이 양 방향 또는 세 방향 이상에서 접근하도록 할 수가 있다. 그 결과, 곡선 채널의 입구에서 곡선 채널이 2 유로 이상 분리될 때, 미세 자성 비드 역시 시작 영역에서 바깥쪽을 따라 흐르도록 설계할 수가 있다.

[0019] 곡선 채널도 2개 이상의 유로를 형성하며 분리되어 자성 수집부로 연결되며, 자성 수집부로 유입된 혼합 시료에는 cfDNA와 결합된 미세 자성 비드가 현저하게 증가된 비율로 존재하고, 목적하는 cfDNA를 검출할 수가 있다.

[0020] 곡선 채널은 다양한 형상으로 형성될 수 있다. 예를 들어, 나선형, 지그재그형 등 다양한 형상으로 형성될 수 있다. 곡선 채널을 나선형으로 형성하는 경우, 나선형 곡선 채널은 혼합시료를 바깥쪽에서 안쪽으로 안내하는 제1 나선부, 혼합시료를 안쪽에서 바깥쪽으로 안내하는 제2 나선부, 및 제1 나선부와 제2 나선부를 중심에서 연결하는 변곡부를 포함할 수 있다.

[0021] 상술한 본 발명의 목적들을 달성하기 위한 본 발명의 예시적인 일 실시예에 따르면, cfDNA를 검출하기 위한 미세유체장치의 검출방법은 무세포 유전물질을 포함하는 제1 시료 및 미세 자성 비드를 포함하는 제2 시료가 혼합된 혼합 시료를 적어도 일 지점에서 변곡되는 곡선 채널로 공급하는 단계, 곡선 채널 상에 복수의 미세 필라가 형성된 적어도 하나의 미세 필라 섹터를 형성하여 혼합 시료가 미세 필라 섹터를 통과하도록 유도하는 단계, 및 곡선 채널의 출구에 자성 수집부를 형성하여 곡선 채널을 통과한 혼합 시료로부터 미세 자성 비드를 수집하는 단계를 구비하며, 상기 곡선 채널을 통과하면서 혼합 시료 내에서는 원심력 또는 구심력 방향으로 이동이 발생하여 제1 혼합이 진행되고, 미세 필라 섹터를 통과하면서 미세 필라에 의해서 혼합 시료의 제2 혼합이 진행되며, 곡선 채널 중 변곡되는 지점을 통과하면서 제1 혼합의 방향이 역전될 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 미세유체장치 및 검출방법에 따르면, 외부 동력과 같은 추가 장비 없이 cfDNA를 검출할 수 있기 때문에 마이크로플루이딕 칩과 같은 미세유체장치에서도 구현이 가능하다. 단, 미세유체장치는 일반적으로 층류가 형성되기 때문에 비드와 cfDNA 간의 자연스러운 혼합을 기대하기 어려우며, 이에 따라 곡선 채널에 의한 횡방향 혼합, 미세 필라 섹터를 이용한 인위적인 흐름의 형성, 그리고 곡선 채널의 역전에 따른 혼합 효과 증가 등을 기대할 수 있다.

[0023] 전반적으로 본 발명에 따르면, 미세유체장치 내에서도 자성 비드와 cfDNA의 혼합 효율을 높일 수 있으며, 적은 양의 혈장 또는 유체에서 상대적으로 빠르게 혼합시켜 검출함으로써 빠르면서 효율적인 질병 진단이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세유체장치 및 검출방법을 설명하기 위한 사시도이다.

도 2는 도 1의 미세유체장치를 설명하기 위한 평면도이다.

도 3은 도 1의 곡선 채널을 설명하기 위한 부분 확대 사시도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 곡선 채널 내에서의 제1 혼합을 설명하기 위한 부분 확대도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 필라 섹터 내에서의 제2 혼합을 설명하기 위한 부분 확대도이다.

도 6은 미세 필라 섹터에서 미세 필라를 제외한 상태에서 곡선 채널 내에서의 흐름을 설명하기 위한 사진이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 곡선 채널 및 정상적인 미세 필라 섹터를 포함하는 미세유체장치 내에서의 흐름을 설명하기 위한 사진이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세유체장치의 곡선 채널을 설명하기 위한 평면도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세하게 설명하지만, 본 발명이 실시예에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 참고로, 본 설명에서 동일한 번호는 실질적으로 동일한 요소를 지칭하며, 상기 규칙 하에서 다른 도면에 기재된 내용은 인용하여 설명할 수 있고, 당업자에게 자명하다고 판단되거나 반복되는 내용은 생략될 수 있다.
- [0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세유체장치 및 검출방법을 설명하기 위한 사시도이며, 도 2는 도 1의 미세유체장치를 설명하기 위한 평면도이고, 도 3은 도 1의 곡선 채널을 설명하기 위한 부분 확대 사시도이다.
- [0027] 도 1 내지 도 3을 참조하면, 미세유체장치(100)는 제1 유입구(120), 제1 유입 채널(125), 제2 유입구(130), 제2 유입채널(135), 곡선 채널(140), 미세 필라 섹터(150), 자성 수집부(170) 및 배출구(180)를 포함할 수 있다.
- [0028] 제1 유입구(120)는 무세포 유전물질, 즉 cfDNA를 포함하는 제1 시료가 유입되는 위치로서, 외부의 소스와 연결되거나 동일 미세유체장치 내에서 히팅과 버퍼를 통과한 상태의 혈장과 바로 연결될 수가 있다. 제2 유입구(130)는 하나의 유로를 형성하는 제1 유입 채널(125)을 통해서 곡선 채널(140)의 입구(142)에 연결될 수 있다.
- [0029] 제2 유입구(130)는 미세 자성 비드를 포함하는 제2 시료가 유입되는 위치로서, 역시 외부의 다른 소스와 연결되거나 동일 미세유체장치 내의 다른 모듈과 직접 연결될 수도 있다. 제2 유입구(130)는 2개의 유로를 형성하는 제2 유입 채널(135)을 통해서 곡선 채널(140)의 입구(142)에 연결되며, 곡선 채널(140)의 입구(142)에서 제1 유입 채널(125)을 중심으로 양측에서 연결될 수 있다. 따라서, 곡선 채널(140)의 입구(142) 이후로 제1 시료가 주로 중심으로 흐르고 미세 자성 비드를 포함하는 제2 시료가 주로 양측으로 흐르는 층류가 형성될 수 있다.
- [0030] 곡선 채널(140)은 제1 및 제2 시료가 혼합된 혼합 시료를 통과시키며, 적어도 일 지점에서 변곡된다. 본 실시예에서 곡선 채널(140)은 나선형을 제공되며, 나선형으로 선회하며 혼합시료를 바깥쪽에서 안쪽으로 안내하는 제1 나선부(144), 혼합시료를 안쪽에서 바깥쪽으로 안내하는 제2 나선부(146), 및 제1 나선부(144)와 제2 나선부(146)를 중심에서 연결하는 변곡부(148)를 포함할 수 있다. 본 실시예에서, 6개의 곡선 채널(140)이 제공되며, 곡선 채널(140)은 2개의 유로로 분리되어 자성 수집부(170)까지 혼합 시료를 안내할 수 있다.
- [0031] 자성 수집부(170)는 제1 유입구(120) 및 제2 유입구(130)에 대향하는 곡선 채널(140)의 타단, 즉 출구에 연결되며, 자성 수집부(170)에는 자기장이 형성되어 미세 자성 비드를 수집할 수가 있다. 자성 수집부(170)에 자기장을 형성하기 위해서 영구 자석 또는 전자석 등을 이용할 수 있으며, 이에 대해서 종래의 선행기술을 참조할 수 있다. 미세 자성 비드에는 cfDNA가 결합된 형태로 제공될 수 있으며, 결합된 cfDNA의 빈도 또는 성분 분석에 따라 상술한 진단을 가능하게 할 수 있다.
- [0032] 또한, 자성 수집부(170)에는 적어도 하나의 배출구(180)가 연결될 수 있으며, 배출구(180)는 혼합 시료 중 수집되지 않은 나머지를 외부로 배출하거나 특정 저장소에 수집되도록 할 수 있다.
- [0033] 본 실시예에 따른 미세유체장치(180)는 PDMS와 같이 종래의 미세유체칩을 형성하기 위한 소재를 이용하여 몸체(110)를 형성할 수 있으며, 미세한 구조를 형성하기 위해서 포토리소그래프 공정을 이용할 수 있다. 일반적으로 미세 필라 섹터(150)를 제외한 미세채널의 폭은 약 100 μ m 정도로 형성될 수가 있다. 물론, 미세 필라 섹터(150) 및 미세채널의 높이는 약 40 μ m 정도로 동일하게 형성될 수 있다.
- [0034] 도 3을 보면, 미세 필라 섹터(150)는 곡선 채널(140)의 미세 채널보다 상대적으로 넓은 폭으로 형성되며, 그 내부로 상호 교번적으로 형성된 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)를 포함한다. 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)는 혼합 시료의 흐름 방향에 대해 예각을 형성하여 혼합 시료의 주된 흐름을 유지하되 흐름이 정체되거나 거스르지 않게 할 수가 있다.
- [0035] 또한, 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)는 미세 필라 섹터(150)의 벽면으로부터 이격되도록 형성되는 것이 바람직하다. 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)가 미세 필라 섹터(150)의 벽면에 맞닿아 있으며, 해당 방향으로의 흐름이 차단되며, 구석진 부분에서 혼합 시료가 정체되거나 걸돌아 혼합 시료 내의 미세 자성 비드와 cfDNA 간의 결합을 방해할 수가 있다. 대신 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)가 미세 필라 섹터(150)의 벽면으로부터 이격되면, 그 틈으로 혼합 시료가 이동할 수 있고, 오히려 다시 혼합 시료의 주된 흐름

과 합류하면서 혼합 효율을 더 높일 수가 있다.

- [0036] 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)도 혼합 시료의 흐름 방향에 대해 좌우 비대칭으로 형성될 수 있다. 도 3에 도시된 바와 같이, 제1 미세 필라(152)는 제2 미세 필라(154)에 비해 상대적으로 짧은 길이로 형성될 수 있다. 곡선 채널(140) 존재하여도 미세 자성 비드를 주로 포함하는 흐름과 cfDNA를 주로 포함하는 흐름이 서로 층류(laminar flow)를 형성하며 미세 채널 내에서 거의 섞이지 않을 수 있다.
- [0037] 따라서 바람직하게는 상대적으로 짧은 제1 미세 필라(152)가 미세 자성 비드를 주로 포함하는 흐름에 대응하도록 위치하는 것이 좋다. 구체적으로 제1 미세 필라(152)가 최초 변곡되는 지점, 변곡부(148) 이전에는 원심력 방향으로 치우치는 바깥쪽 영역에 형성되고, 최초 변곡되는 지점 이후에는 안쪽 영역에 형성되도록 할 수 있다.
- [0038] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 곡선 채널 내에서의 제1 혼합을 설명하기 위한 부분 확대도이며, 도 5은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 필라 섹터 내에서의 제2 혼합을 설명하기 위한 부분 확대도이다.
- [0039] 도 4를 참조하면, 혼합 시료가 곡선 채널(140)을 통과하는 과정에서도 제1 혼합이 발생할 수 있다. 제1 혼합은 혼합 시료가 곡선의 채널을 통과하면서 채널의 볼록한 안쪽과 오목한 바깥쪽 영역에서 유속의 차이가 발생하게 되고, 혼합 시료에는 원심력 또는 구심력이 발생하게 됨으로써, 반경에 따라 압력의 구배가 발생하여 원심력 또는 구심력 방향으로, 예를 들어 혼합 시료의 흐름이 종방향이라면 횡방향으로 또는 상하 방향으로 딴 유동이라는 시료의 추가 이동이 발생할 수 있다.
- [0040] 도시된 바에 따르면, 채널 중앙에서 바깥쪽으로 이동하는 흐름이 형성될 수 있으며, 그 결과 위아래로 분리되어 선회하는 추가 이동이 발생할 수 있다. 또한, 곡선 채널의 가로 및 세로 비율에 따라서 세로 대비 가로의 비율이 증가할수록 상하 회전에 추가 회전 흐름이 더 발생할 수가 있다.
- [0041] 도 5를 참조하면, 제1 미세 필라(152)에 대응하여 미세 자성 비드(B)의 흐름을 예측할 수 있으며, 미세 자성 비드는 제1 미세 필라(152)의 흐름을 전환하여 안쪽 영역으로 이동하게 하면서 제2 혼합을 진행할 수 있다.
- [0042] 곡선 채널(140) 중 변곡되는 변곡부(148)를 기준으로 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)의 위치가 서로 반대로 변경될 수 있다. 예를 상대적으로 짧은 제1 미세 필라(152)가 변곡부(148)를 통과하기 전에 곡선 채널의 유로 바깥쪽에 형성되지만, 변곡부(148)를 통과한 후에는 유로의 안쪽에 형성될 수가 있다.
- [0043] 본 실시예에서는 제1 미세 필라(152)와 제2 미세 필라(154)를 비대칭으로 형성하고 있으며, 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)의 위치는 변곡되는 지점, 즉 변곡부(148)를 통과하면서 역전되도록 설계될 수 있다. 이렇게 곡선 채널 중 변곡되는 지점을 통과하면서 제1 혼합의 방향이 역전될 수 있다.
- [0044] 실험적으로 나선 구조의 패턴의 딴 넘버를 계산해 보았을 때, 가장 높은 딴 넘버를 갖는 반지름이 가장 작은 부분에서의 값은 유속이 $50\mu\text{l}/\text{min}$, $100\mu\text{l}/\text{min}$, $150\mu\text{l}/\text{min}$ 일 때 각각 0.28, 0.53, $0.80(10^{-7}\text{N})$ 로 제1 혼합 만으로는 믹싱이 충분히 일어나기엔 작은 값을 확인할 수 있다. 반면 곡선 채널(140) 상에 미세 필라 섹터(150)를 형성하고, 내부에 미세 필라를 배치함으로써 미세 필라 주위로 높은 압력이 발생하게 된다.
- [0045] 또한, 곡선 채널(140)이 시작되는 영역에서 미세 자성 비드는 원심력 방향으로 치우친 상태로 곡선 채널(140)에 유입되도록 설계될 수 있다. 일 예로, 도 2에 도시된 바와 같이, 곡선 채널(140)로 유입된 미세 자성 비드는 중앙의 제1 시료를 중심으로 양측에 배치되고, 각각의 곡선 채널(140)에서 바깥쪽 영역을 타고 처음 곡선 채널(140)에 유입될 수 있다.
- [0046] 본 실시예에서는, 제2 유입 채널(135)이 2개로 분기되어 제1 유입 채널(125)의 양측에서 유입되지만, 다른 실시예에 따르면 제2 유입 채널이 세 방향 이상으로 분기되도록 할 수도 있다.
- [0047] 상술한 내용에 따르면, cfDNA를 검출하기 위한 미세유체장치의 검출방법은 무세포 유전물질을 포함하는 제1 시료 및 미세 자성 비드를 포함하는 제2 시료가 혼합된 혼합 시료를 제공하며, 혼합 시료는 적어도 일 지점에서 변곡되는 곡선 채널(140)로 공급되고, 각각 곡선 채널(140)에서는 복수의 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)가 형성된 4개의 미세 필라 섹터(150)를 형성하여 혼합 시료가 미세 필라 섹터(150)를 통과하도록 유도한다. 여기서 변곡부(148)를 중심으로 하나의 곡선 채널(140)에서 2개의 미세 필라 섹터(150)는 변곡부(148) 이전에 배치되고, 나머지 2개의 미세 필라 섹터(150)는 제1 미세 필라(152) 및 제2 미세 필라(154)가 반대로 배치된 상태로 제공될 수 있다.
- [0048] 곡선 채널(140)의 출구에 자성 수집부(170)를 형성할 수 있으며, 곡선 채널(140)을 통과한 혼합 시료로부터 미세 자성 비드를 수집할 수 있으며, 수집된 미세 자성 비드에 결합된 cfDNA를 획득하여 질병 진단 등에 사용할

수가 있다.

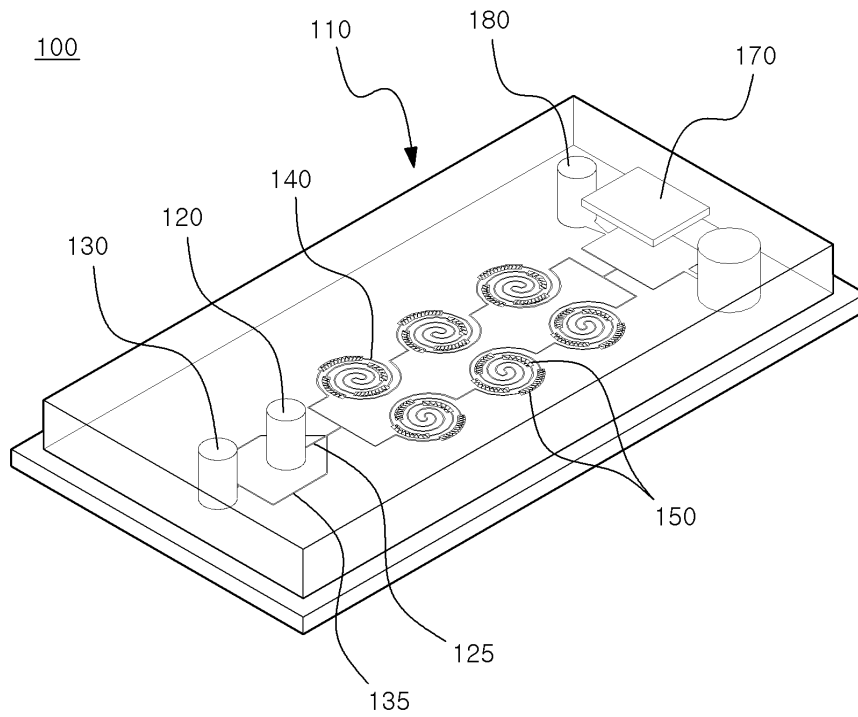
- [0049] 도 6은 미세 필라 섹터에서 미세 필라를 제외한 상태에서 곡선 채널 내에서의 흐름을 설명하기 위한 사진이며, 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 곡선 채널 및 정상적인 미세 필라 섹터를 포함하는 미세유체장치 내에서의 흐름을 설명하기 위한 사진이다.
- [0050] 도 6을 참조하면, 나선형 구조의 곡선 채널을 이용하되, 비드의 움직임을 가시화하기 위해 형광 비드와 멸균 완충 용액(DPBS)을 이용한 것으로서, 이때 비드의 크기는 약 $20\mu\text{m}$ 로 대체로 균일하였고, 형광 비드는 폴리스티렌 재질로 밀도는 $1050\text{kg}/\text{m}^3$ 이었다.
- [0051] 곡선 채널을 이용하여 제1 혼합을 기대할 수 있었지만, 유속이 증가하여도 믹싱 효과가 눈에 띄지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [0052] 도 7을 참조하면, 곡선 채널 및 미세 필라 섹터를 이용한 경우, 즉 직사각모양의 장애물이 있는 경우에 장애물이 없는 경우보다 더욱 믹싱효과가 잘 일어남을 볼 수 있다. 이는 예상대로 유동 속의 입자가 된 유동에 의한 제1 혼합보다는 미세 필라에 의해 발생된 제2 혼합에 지배적인 영향을 받았다고 할 수 있다. 실제로 유속이 $50\mu\text{l}/\text{min}$, $100\mu\text{l}/\text{min}$, $150\mu\text{l}/\text{min}$ 로 증가할수록, 믹싱 효과가 더 증가하는 것도 확인할 수 있다.
- [0053] 본 실시예에 따른 미세유체장치의 효과를 확인하기 위해, 미세유체장치에서 추출한 cfDNA의 농도와 bp의 크기를 정량 분석(quality control) 측정을 진행하였다. cfDNA는 고유한 자성을 띄고 있기 때문에 미세 자성 비드와 결합하게 되고, 이를 자성 수집부에 위치한 자석을 이용하여 추출하였기 때문에 채널의 믹싱 효율을 cfDNA의 농도를 통하여 측정할 수 있다. 미세 자성 비드를 추출하고 이용하는 내용에 대해서는 미국특허 제5,705,628호(1998.01.06.등록)의 내용을 참조할 수 있다.
- [0054] cfDNA는 세포의 괴사, 자살, 분비에 의해서 발생하고 그 크기는 대략 180bp정도의 작은 유전체 DNA(genomic DNA)이다. 총 20.7ng의 DNA를 $200\mu\text{l}$ 의 혈장에서 추출하였고, DNA들 중 180bp 근처에서 cfDNA 피크(peak)가 발생하였기 때문에 자성 미드에 cfDNA가 결합하여 추출된 것을 의미하고 이는 곧 설계한 마이크로 채널의 믹싱 효과가 유의미하다는 것을 뜻한다.
- [0055] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세유체장치의 곡선 채널을 설명하기 위한 평면도이다.
- [0056] 도 8을 참조하면, 곡선 채널(240)은 나선형이 아닌 다른 형상으로도 형성될 수 있으며, 도시된 바와 같이, 지그재그 형상으로 형성될 수 있다. 미세 필라 섹터(250)도 변곡부 또는 그 주변에 형성된 것도 가능하며, 구체적인 미세 필라 섹터의 구조는 이전 실시예의 설명을 참조할 수 있다.
- [0057] 상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술분야의 숙련된 당업자라면 하기의 청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

부호의 설명

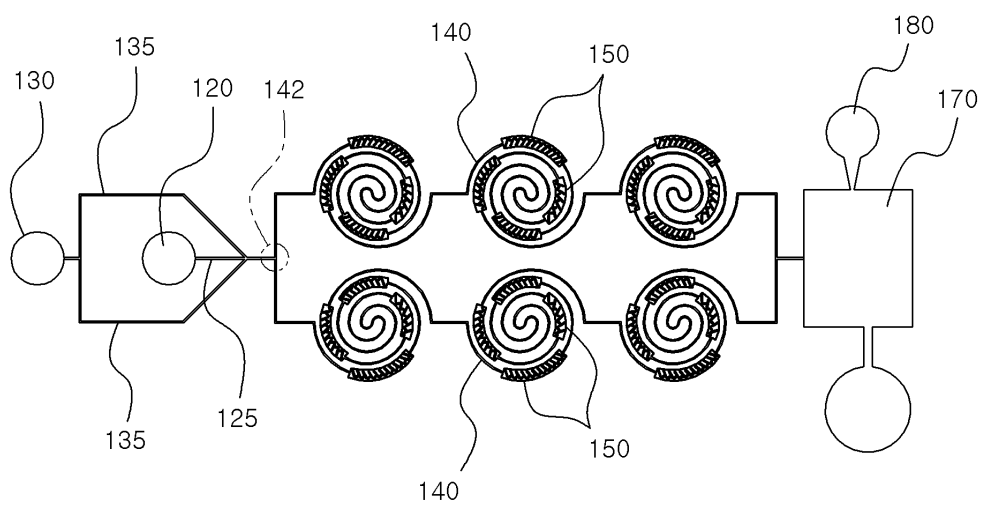
- [0058]
- | | |
|----------------|--------------|
| 100 : 미세유체장치 | 120 : 제1 유입구 |
| 125 : 제1 유입 채널 | 130 : 제2 유입구 |
| 135 : 제2 유입 채널 | 140 : 곡선 채널 |
| 150 : 미세 필라 섹터 | 170 : 자성 수집부 |
| 180 : 배출구 | |

도면

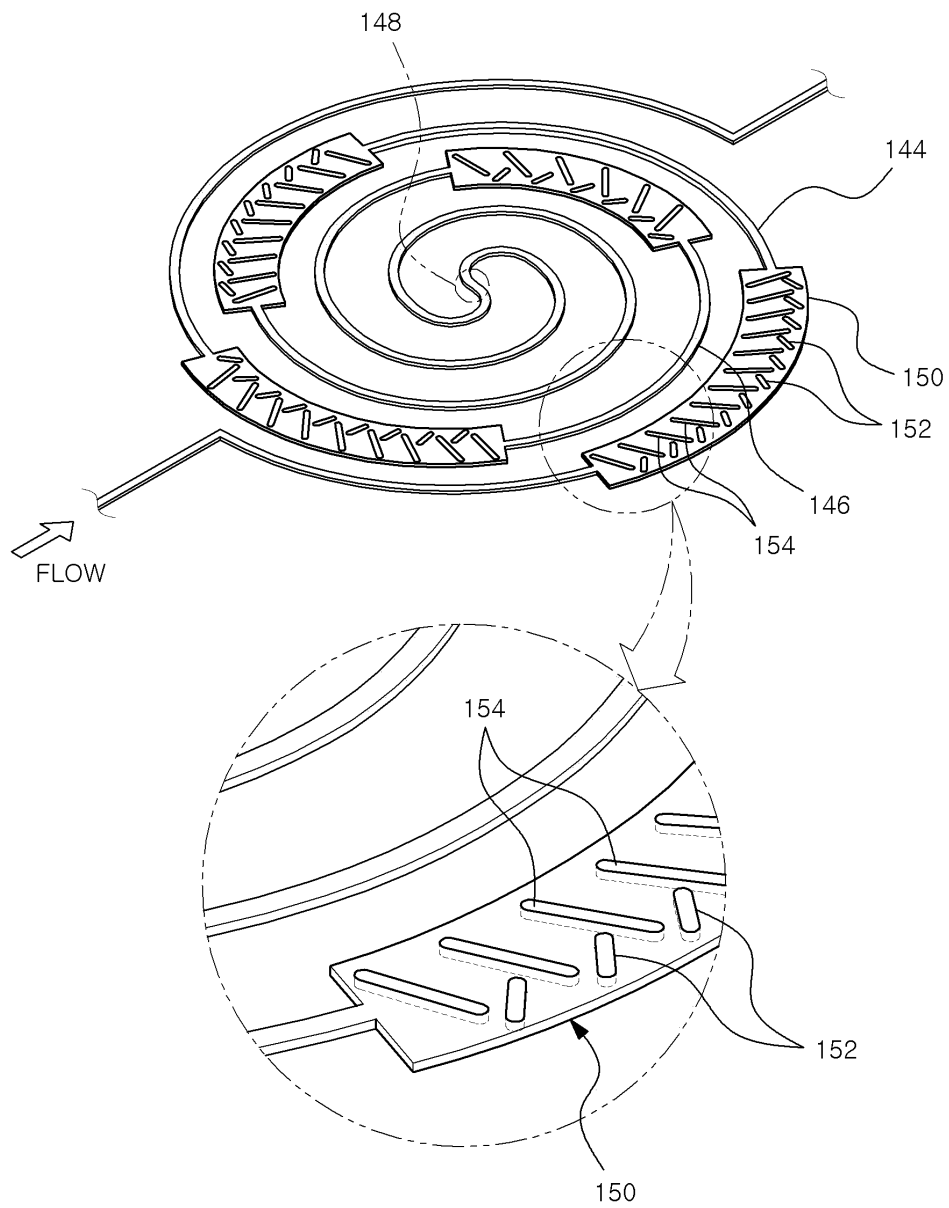
도면1



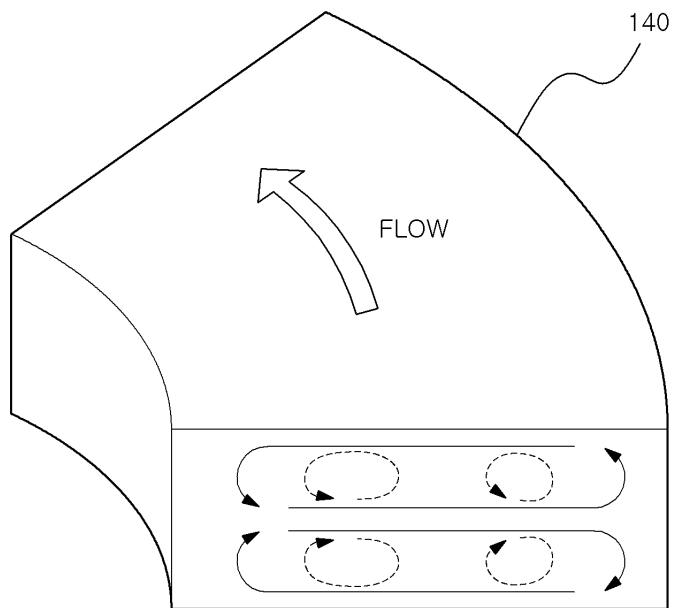
도면2



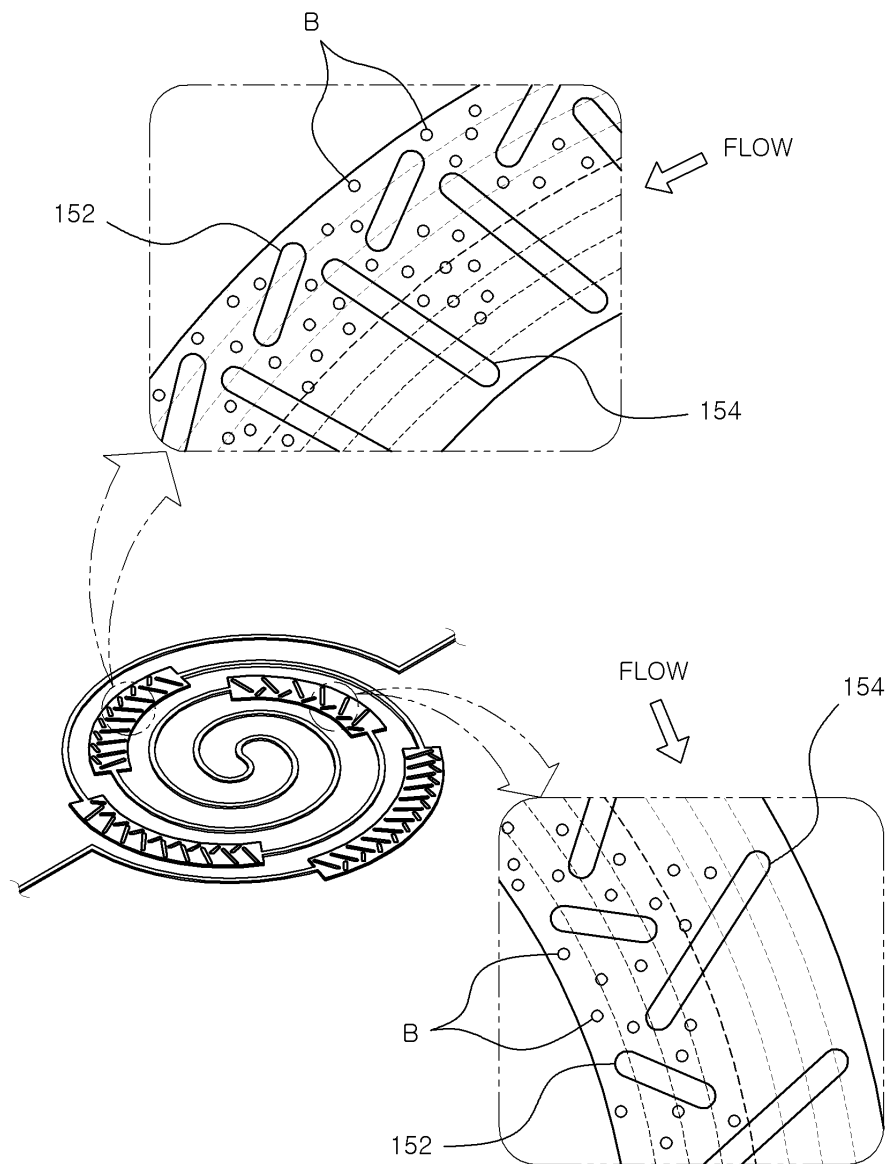
도면3



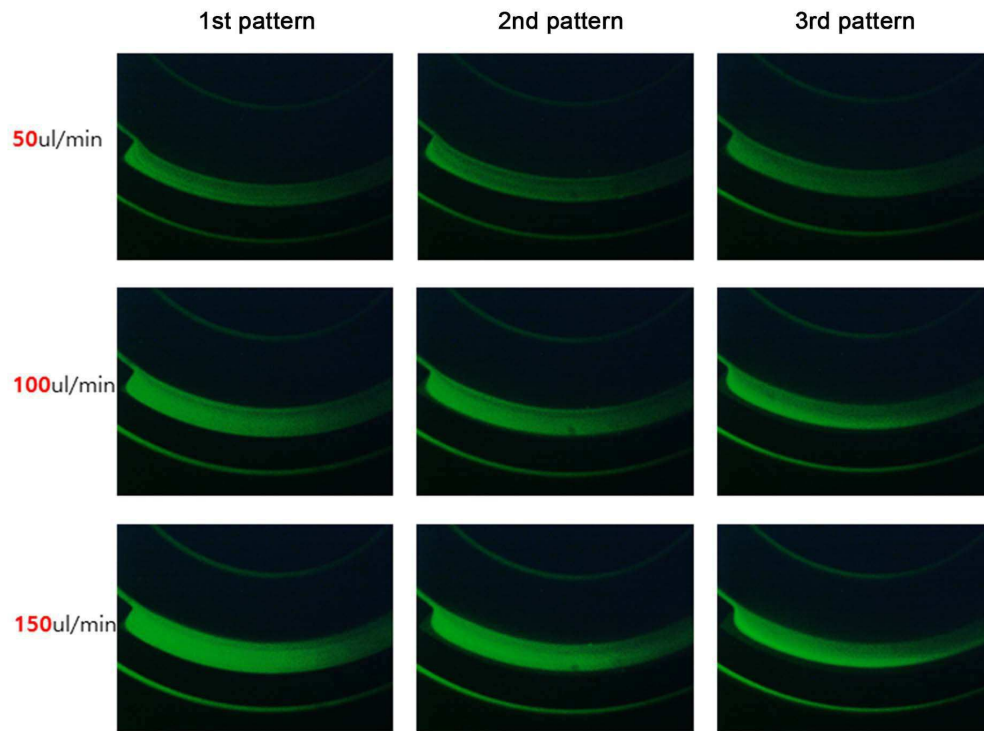
도면4



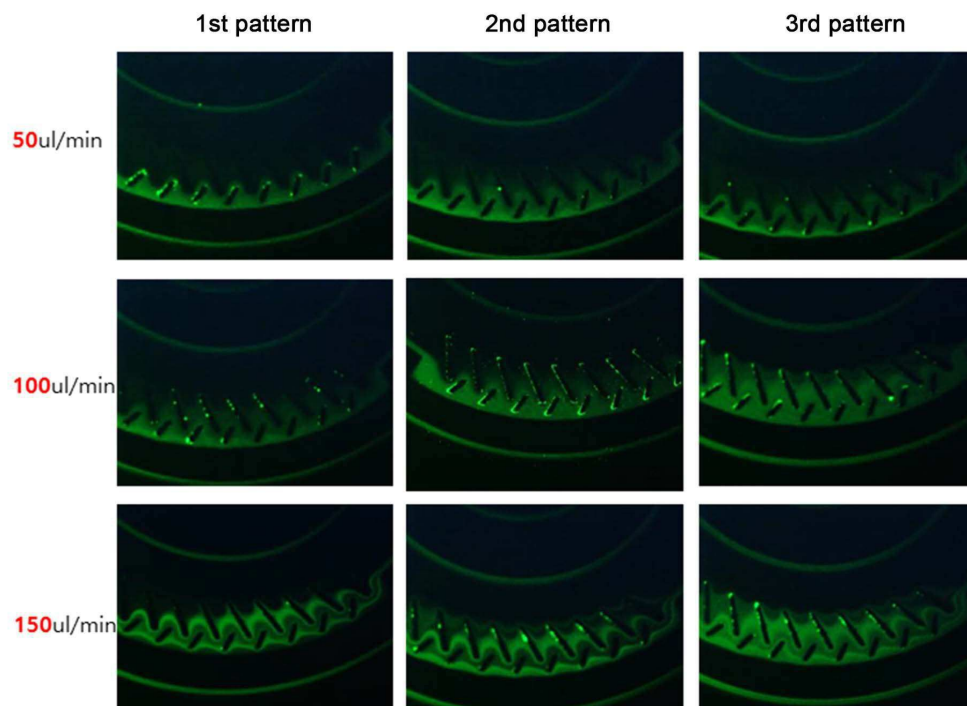
도면5



도면6



도면7



도면8

