



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월14일
 (11) 등록번호 10-1329445
 (24) 등록일자 2013년11월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B81B 7/00 (2006.01) *G01N 27/00* (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2007-7019294
- (22) 출원일자(국제) 2006년01월25일
 심사청구일자 2011년01월25일
- (85) 번역문제출일자 2007년08월23일
- (65) 공개번호 10-2008-0019573
- (43) 공개일자 2008년03월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2006/002550
- (87) 국제공개번호 WO 2006/081270
 국제공개일자 2006년08월03일
- (30) 우선권주장
 60/646,513 2005년01월25일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2004042012 A*
 JP2006504512 A
 JP2005185972 A
 JP2005007352 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
 미국 02139 메사추세츠 캠프리지 메사추세츠 애브뉴 77
- (72) 발명자
 한조균
 미국 01730 메사추세츠주 베드포드 애플트리 레인 5
 왕 잉-치
 미국 02142 메사추세츠주 캠프리지 아파트 12비 왓스워드스트리트 60
- (74) 대리인
 김영, 양영준

전체 청구항 수 : 총 71 항

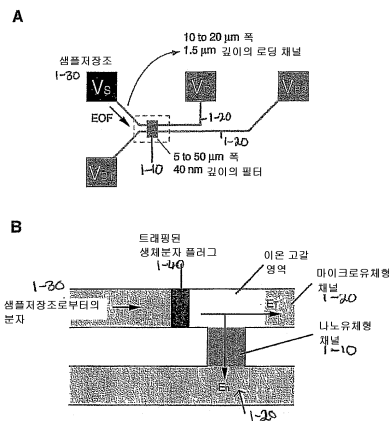
심사관 : 정세환

(54) 발명의 명칭 동전기적 농축 장치 및 그의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 목표로 하는 종의 농축 장치 및 그 사용 방법 및/또는 그러한 장치에서 액체 유동을 제어하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 특히 나노채널에 연결되어 있는 마이크로채널을 포함하는 장치를 이용함으로써, 나노채널에서의 전장의 유도가 마이크로채널과 나노채널 사이의 연결 영역에서 이온 고갈을 초래하며, 마이크로채널 내부에 공간 전하층이 형성되고, 이로써 상기 목표로 하는 종에 대한 에너지 장벽이 제공되어 마이크로채널의 영역에서 상기 종의 농축이 가능해진다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

하나 이상의 마이크로채널(microchannel);

하나 이상의 나노채널(nanochannel);

상기 나노채널에서 전장(electric field)을 유도하기 위한 유닛;

상기 마이크로채널에서 동전기적(electrokinetic) 또는 압력 구동형 유동(pressure driven flow)을 유도하기 위한 유닛; 및

목표로 하는 종(species)을 포함하는 액체가 통과할 수 있는 도관(conduit)

을 포함하여,

상기 마이크로채널이 상기 나노채널에 연결되어 있는 영역에서 이온 고갈(ion depletion)을 일으키고, 상기 마이크로채널 내에 공간 전하층(space charge layer)을 형성하여 상기 목표로 하는 종에 대해 에너지 장벽(energy barrier)을 제공하며, 상기 도관은 상기 마이크로채널에 연결되어 있는 농축 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

목표로 하는 종을 포함하는 액체를 상기 장치에 도입하고, 상기 나노채널 및 상기 마이크로채널에서 상기 전장을 독립적으로 유도하면, 상기 마이크로채널 내에서 상기 목표로 하는 종이 농축되는 농축 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 마이크로채널에서 전장을 유도하기 위한 유닛을 더 포함하고,

상기 나노채널에서 전장을 유도하기 위한 유닛, 또는 상기 마이크로채널에서 전장을 유도하기 위한 유닛, 또는 이들의 조합은 전압 서플라이(voltage supply)인 농축 장치.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 전압 서플라이에 의해 인가된 전압은 50mV 내지 500V인 농축 장치.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 전압 서플라이는 상기 마이크로채널의 애노드측(anodic side)과 캐소드측(cathodic side)에 동일한 전압을 인가하는 농축 장치.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 전압 서플라이는 상기 마이크로채널의 캐소드측에 비해 애노드측에 더 큰 전압을 인가하는 농축 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 마이크로채널의 폭은 1~100 μ m인 농축 장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 마이크로채널의 깊이는 0.5~50 μ m인 농축 장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 나노채널의 폭은 1~50 μ m인 농축 장치.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 나노채널의 깊이는 20~100nm인 농축 장치.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 마이크로채널의 표면은, 상기 표면에 대한 상기 목표로 하는 종의 흡착을 증가 또는 감소시키기 위한 미리 결정된 물질로 코팅되는 농축 장치.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 나노채널 및 상기 마이크로채널 중 적어도 하나의 표면은, 상기 장치의 동작 효율(operation efficiency)을 증가 또는 감소시키도록 기능화된 농축 장치.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 장치의 동작 효율을 증가 또는 감소시키기 위해서 상기 장치의 기관에 외부 게이트 포텐셜(gate potential)이 인가되는 농축 장치.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 마이크로채널이나 상기 나노채널 또는 이들의 조합은 리소그래피 공정 및 에칭 공정에 의해 상기 장치에 형성되는 농축 장치.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 장치는 투명한 물질로 구성되는 농축 장치.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 투명한 물질은 파이렉스(pyrex), 이산화규소, 질화규소, 석영 또는 SU-8인 농축 장치.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 장치는 자가형광성이 낮은(low-autofluorescent) 물질로 코팅되는 농축 장치.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 장치는 분리 시스템, 검출 시스템, 분석 시스템 또는 이들의 조합에 결합되어 있는 농축 장치.

청구항 19

제1항에 있어서,
상기 장치는 조명 소스에 결합되어 있는 농축 장치.

청구항 20

제1항에 있어서,
상기 장치는 다수의 마이크로채널들, 나노채널들 또는 이들의 조합을 포함하는 농축 장치.

청구항 21

제20항에 있어서,
상기 다수의 마이크로채널들, 나노채널들 또는 이들의 조합은 특정한 기하학적 형태로 배열되어 있는 농축 장치.

청구항 22

제21항에 있어서,
상기 기하학적 형태는 상기 나노채널들에 대한 상기 마이크로채널들의 수직 배향을 포함하는 농축 장치.

청구항 23

제22항에 있어서,
각각의 마이크로채널은 2개의 나노채널에 연결되어 있으며, 상기 2개의 나노채널은 상기 마이크로채널에 대해 수직으로 배향되어 있는 농축 장치.

청구항 24

제20항에 있어서,
상기 장치는 나노채널에 각각 연결되어 있는 제1 및 제2 마이크로채널을 포함하고, 상기 제1 마이크로채널에서는 완충 처리된(buffered) 현탁액 또는 용액 중에 샘플이 로딩되며(loaded), 상기 제2 마이크로채널에서는 더 낮은 농도의 상기 완충 처리된 현탁액 또는 용액이 로딩되는 농축 장치.

청구항 25

제1항의 장치를 포함하는 마이크로유체형(microfluidic) 펌프.

청구항 26

제25항에 있어서,
상기 펌프는 10 μ m/초 내지 10mm/초의 액체 유속을 갖는 마이크로유체형 펌프.

청구항 27

삭제

청구항 28

목표로 하는 종을 액체에 농축하는 방법으로서,
소스로부터 농축 장치로 액체를 도입하는 단계 - 상기 액체는 목표로 하는 종을 포함하며, 상기 장치는 나노채널에 연결된 마이크로채널을 포함함 -;
상기 나노채널에서 전장을 유도하여, 상기 마이크로채널이 상기 나노채널에 연결되어 있는 영역에서 이온 고갈(ion depletion)을 일으키고, 상기 마이크로채널 내에 공간 전하층(space charge layer)을 형성하여 상기 목표로 하는 종에 대해 에너지 장벽(energy barrier)을 제공하도록 하는 단계; 및

상기 마이크로채널에서 액체 유동을 유도하는 단계를 포함하는 농축 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,
상기 유동은 전기삼투성(electroosmotic)인 농축 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,
상기 전기삼투성 유동은 상기 마이크로채널에서의 전장의 유도를 통해 상기 마이크로채널에 유도되는 농축 방법.

청구항 31

제28항에 있어서,
상기 유동은 압력 구동형인 농축 방법.

청구항 32

제28항에 있어서,
상기 단계들은 순환 방식으로(cyclically) 수행되는 농축 방법.

청구항 33

제28항에 있어서,
상기 나노채널, 상기 마이크로채널 또는 이들의 조합에서 전장이 유도되는 농축 방법.

청구항 34

제33항에 있어서,
상기 나노채널, 상기 마이크로채널 또는 이들의 조합에서 유도되는 상기 전장은, 상기 나노채널, 상기 마이크로채널 또는 이들의 조합에 전압을 인가하는 것을 통해 이루어지는 농축 방법.

청구항 35

제28항에 있어서,
하나 이상의 마이크로채널은 하나 이상의 나노채널에 연결되어 있으며, 상기 나노채널에 대해 수직으로 배향되어 있는 농축 방법.

청구항 36

제35항에 있어서,
각각의 마이크로채널은 2개의 나노채널에 연결되어 있으며, 상기 2개의 나노채널은 상기 마이크로채널에 대해 수직으로 배향되어 있는 농축 방법.

청구항 37

제28항에 있어서,
제1 마이크로채널 및 제2 마이크로채널은 각각 나노채널에 연결되어 있고, 상기 제1 마이크로채널에서는 완충 처리된 현탁액 또는 용액 중에 샘플이 로딩되며, 상기 제2 마이크로채널에서는 더 낮은 농도의 상기 완충 처리된 현탁액 또는 용액이 로딩되는 농축 방법.

청구항 38

제34항에 있어서,
상기 전압은 50mV 내지 500V인 농축 방법.

청구항 39

제28항에 있어서,
상기 마이크로채널의 애노드측과 캐소드측에 동일한 전압이 인가되는 농축 방법.

청구항 40

제28항에 있어서,
상기 마이크로채널의 캐소드측에 비해 애노드측에 더 큰 전압이 인가되는 농축 방법.

청구항 41

제40항에 있어서,
상기 마이크로채널의 상기 애노드측에 상기 더 큰 전압을 인가하기 전에, 공간 전하층이 상기 마이크로채널에 생성되는 농축 방법.

청구항 42

제28항에 있어서,
상기 마이크로채널의 폭은 1~100 μ m인 농축 방법.

청구항 43

제28항에 있어서,
상기 마이크로채널의 깊이는 0.5~50 μ m인 농축 방법.

청구항 44

제28항에 있어서,
상기 나노채널의 폭은 1~50 μ m인 농축 방법.

청구항 45

제28항에 있어서,
상기 나노채널의 깊이는 20~100nm인 농축 방법.

청구항 46

제28항에 있어서,
상기 마이크로채널의 표면은, 상기 표면에 대한 상기 목표로 하는 종의 흡착을 증가 또는 감소시키기 위한 미리 결정된 물질로 코팅되는 농축 방법.

청구항 47

제28항에 있어서,
상기 나노채널 및 상기 마이크로채널 중 적어도 하나의 표면은, 상기 장치의 동작 효율을 증가 또는 감소시키도록 기능화된 농축 방법.

청구항 48

제28항에 있어서,

상기 장치의 동작 효율을 증가 또는 감소시키기 위해서 상기 장치의 기판에 외부 게이트 포텐셜이 인가되는 농축 방법.

청구항 49

제28항에 있어서,

상기 마이크로채널이나 상기 나노채널 또는 이들의 조합은 리소그래피 공정 및 에칭 공정에 의해 상기 장치에 형성되는 농축 방법.

청구항 50

제28항에 있어서,

상기 액체는 현탁액 또는 용액인 농축 방법.

청구항 51

제50항에 있어서,

상기 현탁액은 유기 호모제네이트(organ homogenate), 세포 추출물(cell extract) 또는 혈액 샘플인 농축 방법.

청구항 52

제28항에 있어서,

상기 목표로 하는 종은 단백질, 폴리펩티드, 핵산, 바이러스 입자(viral particles) 또는 이들의 조합을 포함하는 농축 방법.

청구항 53

제28항에 있어서,

상기 장치는 투명한 물질로 구성되는 농축 방법.

청구항 54

제53항에 있어서,

상기 투명한 물질은 파이렉스, 이산화규소, 질화규소, 석영 또는 SU-8인 농축 방법.

청구항 55

제28항에 있어서,

상기 장치는 자가형광성이 낮은 물질로 코팅되는 농축 방법.

청구항 56

제28항에 있어서,

상기 장치는 분리 시스템, 검출 시스템, 분석 시스템 또는 이들의 조합에 결합되어 있는 농축 방법.

청구항 57

제28항에 있어서,

상기 장치는 조명 소스에 결합되어 있는 농축 방법.

청구항 58

제28항에 있어서,

상기 목표로 하는 종을 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)으로 처리하는 단계를 더 포함하는 농축 방

법.

청구항 59

제28항에 있어서,

상기 장치로부터 상기 목표로 하는 종을 방출하는 단계를 더 포함하는 농축 방법.

청구항 60

제28항에 있어서,

상기 방법은, 상기 목표로 하는 종이 상기 액체 중에 검출 한계 미만인 농도로 존재하는 경우에 상기 목표로 하는 종을 검출하는데 이용되는 농축 방법.

청구항 61

시스템에서 액체의 유동을 제어하는 방법으로서,

상기 시스템에서 소스로부터 펌핑 장치로 상기 액체를 도입하는 단계 - 상기 장치는 나노채널에 연결된 마이크로채널을 포함하며, 상기 액체는 하전된 종(charged species) 또는 양쪽성 종(amphoteric species)을 포함함 -;

상기 나노채널에서 전장을 유도하여, 상기 마이크로채널이 상기 나노채널에 연결되어 있는 영역에서 이온 고갈을 일으키고, 상기 마이크로채널 내에 공간 전하층을 형성하여 목표로 하는 상기 종에 대해 에너지 장벽을 제공하도록 하는 단계; 및

상기 마이크로채널에서 전장을 유도하여, 상기 마이크로채널에서 전기삼투성 유동을 유도하는 단계 - 상기 유동은 상기 액체를 상기 장치로 또한 도입하며, 상기 유동은 상기 전장의 강도에 의해 제어됨 -

를 포함하는 제어 방법.

청구항 62

제61항에 있어서,

상기 나노채널, 상기 마이크로채널 또는 이들의 조합에서 전장이 유도되는 제어 방법.

청구항 63

제62항에 있어서,

상기 나노채널, 상기 마이크로채널 또는 이들의 조합에서 유도되는 상기 전장은, 상기 나노채널, 상기 마이크로채널 또는 이들의 조합에 전압을 인가하는 것을 통해 이루어지는 제어 방법.

청구항 64

제63항에 있어서,

상기 전압은 50mV 내지 500V인 제어 방법.

청구항 65

제61항에 있어서,

상기 마이크로채널의 애노드측과 캐소드측에 동일한 전압이 인가되는 제어 방법.

청구항 66

제61항에 있어서,

상기 마이크로채널의 캐소드측에 비해 애노드측에 더 큰 전압이 인가되는 제어 방법.

청구항 67

제66항에 있어서,

상기 마이크로채널의 상기 애노드측에 상기 더 큰 전압을 인가하기 전에, 공간 전하층이 상기 마이크로채널에 생성되는 제어 방법.

청구항 68

제61항에 있어서,

상기 마이크로채널의 폭은 1~100 μ m인 제어 방법.

청구항 69

제61항에 있어서,

상기 마이크로채널의 깊이는 0.5~50 μ m인 제어 방법.

청구항 70

제61항에 있어서,

상기 나노채널의 폭은 1~50 μ m인 제어 방법.

청구항 71

제61항에 있어서,

상기 나노채널의 깊이는 20~100nm인 제어 방법.

청구항 72

제61항에 있어서,

상기 전기삼투성 유동은 500 μ m/초 내지 1mm/초의 유속을 갖는 제어 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 용액 중 목표로 하는 하전된 종(charged species of interest)을 농축하는 장치 및 그의 사용 방법을 제공한다. 본 발명은 농축 장치로서, 목표로 하는 하전된 종의 동전기적 트래핑(electrokinetic trapping)을 기초로 하고, 계속해서 상기 하전된 종은 분리되어 분석될 수 있다.

배경기술

[0002] 단백질 유전 정보학(proteomics)의 주된 과제 중 하나는 혈청 또는 세포 추출물과 같은 생체분자(biomolecule) 샘플의 지대한 복잡성이다. 전형적 혈액 샘플은 10,000개가 넘는 상이한 단백질 종을 함유할 수 있고, 그 농도는 9자리 수의 크기로 변동될 수 있다. 그러한 단백질의 다양성은 엄청난 농도 범위와 아울러 단백질 유전 정보학에서의 샘플 제조에 대한 만만치 않은 난제이다.

[0003] 다차원 분리 단계 및 질량분석법(MS)을 기초로 하는 종래의 단백질 분석 기법은 제한된 분리 피크 용량(약 3,000 이하) 및 검출의 동적 범위($\sim 10^4$)로 인해 불충분하다. 마이크로유체형(microfluidic) 생체분자 분석 시스템(이른바 μ TAS)은 자동화 생체분자 처리에 대한 전도를 밝게 한다. 다양한 생체분자 분리 및 정제 단계는 화학 반응 및 확장(amplification)과 아울러 마이크로칩(microchip) 상에 소형화되었고, 수십, 수 백배 빠른 샘플 분리와 처리를 나타낸다. 또한, 두 가지 상이한 분리 단계를 다차원 분리 장치 내에 마이크로유체형으로 집적화(integration)하는 방법이 제시되었다. 그러나, 대부분의 마이크로유체 분리 및 샘플 처리 장치는 샘플 체적의 미스매치(mismatch)라는 결정적 문제를 가진다. 마이크로유체 장치는 1pL~1nL의 샘플 유체의 취급 및 처리에는 매우 효율적이지만, 대부분의 생체분자 샘플은 1 μ l를 넘는 액체 체적으로 활용되거나 취급된다. 따라서, 마이크로칩 기반의 분리 기술은 종종 활용가능한 샘플의 적은 부분만을 분석하게 되고, 이에 따라 전체적 검출 민감도가 현저히 제한된다. 단백질 유전 정보학에서, 이 문제는 풍부한 정보의 신호 발생 분자(signaling molecule)(예를 들면 사이토킨 및 바이오마커)가 미량의 농도(nM~pM 범위)로만 존재하며, 단백질

및 펩티드에 대한 폴리메라아제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)과 같은 신호 확장 기법이 없다는 사실로 인해 더욱 악화된다.

[0004] 따라서, μl 이상의 전형적 샘플 체적을 취하여 더 작은 체적으로 분자를 농축함으로써, 훨씬 더 민감하게 분자를 분리하고 검출할 수 있도록 하는 효율적인 샘플 농축기가 요망된다. 액중에서 샘플을 예비농축하기 위해 현재 몇 가지 방안을 활용할 수 있는데, 그중에는 필드-확장 샘플 스택킹(field-amplified sample stacking; FAS), 등속영동(isotachopheresis; ITP), 동전기적 트래핑, 미셀의 동전기적 스위핑, 크로마토그래픽 예비농축 및 멤브레인 예비농축이 포함된다. 이러한 기법 중 많은 것이 본래 모세관 전기영동을 위해 개발되고, 특수한 버퍼 장치 및/또는 시약을 필요로 한다. 크로마토그래픽 및 여과 기반 예비농축 기법의 효율은 목표 분자의 소수성(hydrophobicity) 및 크기에 의존한다. 동전기적 트래핑은 임의의 하전된 생체분자 종에 대해 사용될 수 있지만, 일반적으로 조작을 위해서는 나노 기공의 전하-선택성(charge-selective) 멤브레인을 필요로 한다. 종합적으로, 기존 예비농축 스킴에 대해 제시된 농도 인자는 약 1000에 한정되어 있으며, 일체화된 마이크로시스템에 그것을 적용하는 것은 시약 및 재료의 요건과 같은 다양한 조작 측면의 제약으로 인해 용이하지 않다.

발명의 상세한 설명

- [0005] 본 발명은, 일 실시예에서,
- [0006] 마이크로채널(microchannel);
- [0007] 나노채널(nanochannel);
- [0008] 상기 나노채널 내에서 전장을 유도하기 위한 유닛;
- [0009] 상기 마이크로채널에서 동전기적 또는 압력 구동형 유동(pressure driven flow)을 유도하기 위한 유닛; 및
- [0010] 목표로 하는 종을 포함하는 액체가 통과할 수 있는 도관(conduit)
- [0011] 을 포함하고,
- [0012] 상기 마이크로채널은 상기 나노채널에 연결되어 있고, 상기 도관은 상기 마이크로채널에 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 농축 장치를 제공한다.
- [0013] 또 다른 실시예에서, 상기 나노채널, 상기 마이크로채널 또는 그의 조합에서 전장을 유도하기 위한 수단은 전압 서플라이(voltage supply)이다. 일 실시예에서, 인가되는 전압은 50mV 내지 500V이다. 일 실시예에서, 상기 전압 서플라이는 마이크로채널의 애노드측 및 캐소드측에 동일한 전압을 인가하고, 또는 다른 실시예에서 상기 전압 서플라이는 마이크로채널의 캐소드측에 비해 애노드측에 더 큰 전압을 인가한다.
- [0014] 일 실시예에서, 상기 마이크로채널의 폭은 1~100 μm 이고, 또 다른 실시예에서, 상기 마이크로채널의 깊이는 0.5~50 μm 이다. 또 다른 실시예에서, 상기 마이크로채널의 폭은 1~50 μm 이고, 또 다른 실시예에서, 상기 마이크로채널의 깊이는 20~100 nm이다.
- [0015] 일 실시예에서, 상기 마이크로채널의 표면은 목표로 하는 상기 종의 상기 표면에 대한 흡수를 감소시키거나 증강시키도록 기능화되었다. 또 다른 실시예에서, 상기 나노채널 및/또는 마이크로채널의 표면은 상기 장치의 조작 효율을 증강시키거나 감소시키도록 기능화되었다. 또 다른 실시예에서, 상기 장치의 조작 효율을 증강시키거나 감소시키도록 상기 장치의 기관에 외부 게이트 포텐셜(gate potential)이 인가된다. 또 다른 실시예에서, 상기 장치는 투명한 재료로 구성된다. 또 다른 실시예에서, 상기 투명한 재료는 파이렉스(pyrex), 이산화규소, 질화규소, 석영 또는 SU-8이다.
- [0016] 또 다른 실시예에서, 상기 장치는 분리 시스템에 결합되고, 또 다른 실시예에서는 검출 시스템에, 또 다른 실시예에서는 분석 시스템, 또는 또 다른 실시예에서는 이들의 조합에 결합되어 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 장치는 조명 소스(illumination source)에 결합되어 있다.
- [0017] 또 다른 실시예에서, 상기 장치는 다중 마이크로채널, 나노채널 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시예에서, 마이크로채널, 나노채널 또는 이들의 조합은 특별한 기하학적 형태로 배열되고, 일 실시예에서 그 배열은 상기 나노채널에 대한 마이크로채널의 수직 배향을 포함한다.
- [0018] 일 실시예에서, 본 발명은 목표로 하는 종을 액체 중에서 농축하는 방법으로서, 본 발명에 따른 장치를 사용하는 단계를 포함하는 농축 방법을 제공한다.

- [0019] 일 실시예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 장치를 포함하는 마이크로유체용 펌프로서, 일 실시예에서 10 μm /초 내지 10 mm/초의 액체 유속을 가진 펌프를 제공한다.
- [0020] 일 실시예에서, 본 발명은 목표로 하는 종을 액체 중에서 농축하는 방법으로서,
- [0021] 목표로 하는 종을 포함하는 액체를 소스로부터, 나노채널에 연결된 마이크로채널을 포함하는 농축 장치에 도입하는 단계;
- [0022] 상기 나노채널 내에서 전장을 유도함으로써 상기 마이크로채널이 상기 나노채널에 연결되어 있는 영역에서 이온 고갈(ion depletion)을 일으키고, 상기 마이크로채널 내에 공간 전하층(space charge layer)을 형성하여 상기 목표로 하는 종에 대한 에너지 장벽(energy barrier)을 제공하도록 하는 단계; 및
- [0023] 상기 마이크로채널 내에서 액체 유동을 유도하는 단계
- [0024] 를 포함하는 농축 방법을 제공한다.
- [0025] 일 실시예에서, 상기 유동은 전기삼투성(electroosmotic)이고, 다른 실시예에서, 상기 전기삼투성 유동은 마이크로채널 내 전장의 유도를 통해 마이크로채널 내에서 유도된다. 또 다른 실시예에서, 상기 유동은 압력에 의해 구동된다.
- [0026] 일 실시예에서, 마이크로채널의 애노드측과 캐소드측에 동일한 전압이 인가되고, 또는 다른 실시예에서는 마이크로채널의 캐소드측에 비해 애노드측에 더 큰 전압이 인가된다. 또 다른 실시예에서, 상기 마이크로채널의 애노드측에 더 큰 전압을 인가하기 전에 공간 전하층이 마이크로채널 내에 생성된다.
- [0027] 일 실시예에서, 상기 액체는 용액이다. 또 다른 실시예에서, 상기 액체는 현탁액(suspension)이고, 이것은 또 다른 실시예에서 유기 호모제네이트(organ homogenate), 세포 추출물 또는 혈액 샘플이다. 일 실시예에서, 목표로 하는 종은 단백질, 폴리펩티드, 핵산, 바이러스 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0028] 일 실시예에서, 상기 방법은 목표로 하는 종을 모세관 전기영동 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 목표로 하는 종을 상기 장치로부터 방출하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시예에서, 상기 방법은 목표로 하는 상기 종이 상기 액체 중에 검출 한계 미만의 농도로 존재할 경우에 상기 종을 검출하기 위해 활용된다.
- [0029] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 시스템 내에서 액체 유동을 제어하는 방법으로서,
- [0030] 하전된 종 또는 양쪽성 종(amphoteric species)을 포함하는 상기 액체를 소스로부터, 나노채널에 연결된 마이크로채널을 포함하는 상기 시스템 내의 펌핑 장치에 도입하는 단계;
- [0031] 상기 나노채널 내에서 전장을 유도함으로써 상기 마이크로채널이 상기 나노채널에 연결되어 있는 영역에서 이온 고갈을 일으키고, 상기 마이크로채널 내에 공간 전하층을 형성하여 상기 목표로 하는 종에 대한 에너지 장벽을 제공하도록 하는 단계; 및
- [0032] 상기 마이크로채널 내에서 전장을 유도함으로써 상기 마이크로채널 내에 전기삼투성 유동을 유도하고, 상기 유동은 상기 액체를 상기 장치 내로 추가로 도입하고, 상기 유동은 상기 전장의 강도에 의해 제어되도록 하는 단계
- [0033] 를 포함하는 제어 방법을 제공한다.

실시예

- [0042] 일 실시예에서, 본 발명은,
- [0043] 마이크로채널;
- [0044] 나노채널;
- [0045] 상기 나노채널 내에서 전장을 유도하기 위한 유닛;
- [0046] 상기 마이크로채널에서 동전기적 또는 압력 구동형 유동을 유도하기 위한 유닛; 및
- [0047] 목표로 하는 종을 포함하는 액체가 통과할 수 있는 도관
- [0048] 을 포함하고,

- [0049] 상기 마이크로채널은 상기 나노채널에 연결되어 있고, 상기 도관은 상기 마이크로채널에 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 농축 장치를 제공한다.
- [0050] 상기 농축 장치는 "농축기(concentrator)"라고 지칭되는 것으로, 또 다른 실시예에서, 하나 이상의 마이크로채널 및 하나 이상의 나노채널을 포함한다. 일 실시예에서, 상기 농축기는 각각의 채널을 형성하기 위한 마이크로조립(microfabrication) 및 나노조립(nanofabrication) 기술을 이용하여 형성된다.
- [0051] 마이크로조립 기술, 다른 용어로 마이크로기술 또는 MEMS는 일 실시예에서, 예를 들면 물리적 구조물의 형성을 위해 반도체 조립의 기구와 공정을 적용한다. 마이크로조립 기술에 의하면, 일 실시예에서, 실리콘, 유리, 또는 플라스틱으로 만들어진 칩 상에 1mm 미만 내지 수 cm 범위의 치수를 가진 형상물(예컨대, 웰, 채널)을 정밀하게 설계할 수 있다. 그러한 기술은 일 실시예에서, 농축기의 마이크로채널을 형성하는 데 사용될 수 있다.
- [0052] 또 다른 실시예에서, NEMS 즉 나노기술은 농축기의 나노채널을 형성하는 데 사용된다. 일 실시예에서, 나노채널은 하기 참고 문헌에 기재된 바와 같이 나노임프린트 리소그래피(nanoimprint lithography; NIL)에 의해 제조될 수 있으며, 동 참고 문헌은 전체가 인용되어 본 명세서에 포함된다: Z.N. Yu, P. Deshpande, W. Wu, J. Wang 및 S.Y. Chou, Appl. Phys. Lett. 77(7), 927(2000); S.Y. Chou, P.R. Krauss, 및 P.J. Renstrom, Appl. Phys. Lett. 67(21), 3114(1995); Stephen Y. Chou, Peter R. Krauss 및 Preston J. Renstrom, Science 272, 85 (1996) 및 U.S. Pat. No. 5,772,905. 일 실시예에서, 나노채널 및/또는 마이크로채널은 나노임프린트 리소그래피, 간섭 리소그래피, 자가-조립 코폴리머 패턴 전사, 스핀 코팅, 전자빔 리소그래피, 초점화 이온빔 밀링, 포토리소그래피, 반응성 이온 에칭(ion-etching), 습식 에칭(wet-etching), 플라즈마 강화 화학증착법, 전자빔 증발법, 스퍼터 증착법 및 이들의 조합 기법에 의해 형성될 수 있다. 이와는 달리, 다른 종래의 방법을 이용하여 나노채널 및/또는 마이크로채널을 형성할 수 있다.
- [0053] 일 실시예에서, 나노채널 및 마이크로채널은 이하의 실시예 1에 예시된 바와 같이, 그리고 J. Han, H.G. Craighead, J. Vac. Sci. Technol., A 17, 2142-2147 (1999) 및 J. Han, H.G. Craighead, Science 288, 1026-1029 (2000)에 기재된 바와 같이 형성되고, 상기 문헌은 전체가 인용되어 본 명세서에 포함된다.
- [0054] 일 실시예에서, 일련의 반응성 이온 에칭이 실행되고, 그 후 표준 리소그래피 기구에 의해 나노채널이 패터닝된다. 일 실시예에서, 상기 에칭은 특별한 형상으로 실행되는데, 그것은 또 다른 실시예에서 마이크로채널들 및/또는 나노채널들 사이의 계면을 결정한다. 일 실시예에서, 마이크로채널을 생성하는 에칭은 나노채널을 위한 에칭이 생성되는 평면에 평행하게 실행된다. 또 다른 실시예에서, 예를 들면 로딩 홀(loadng hole)을 생성하기 위한 농축기 내 추가적 구조를 생성하기 위해, 예를 들면 KOH 에칭과 같은 추가적 에칭이 사용되었다.
- [0055] 또 다른 실시예에서, 농축기의 전기 절연이 실행된다. 일 실시예에서, 그러한 절연은 농축기의 질화물 스트리핑(nitride stripping) 및 열적 산화(thermal oxidation)를 통해 달성된다. 또 다른 실시예에서, 바닥 표면인 농축기의 표면이, 예를 들면 파이렉스 웨이퍼와 같은 기판에 고정될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 웨이퍼는 애노드 접합 기술을 이용하여 고정될 수 있다.
- [0056] 일 실시예에서, 농축기의 구성은 당업자에게 알려져 있는 방법에 의해, 또는 예를 들면 미국 특허 제6,753,200 호에 기재되어 있는 방법을 채택함으로써 달성될 수 있다.
- [0057] 일 실시예에서, 상기 조립은 영구적인 바닥과 천장층(ceiling layer) 사이에 삽입되어 있는 성형된 희생층(sacrificial layer)을 이용할 수 있고, 상기 희생층의 형상은 작동 갭(working gap)을 한정한다. 희생층이 제거되면, 작동 갭은 원하는 형상을 가진 유체 채널이 된다. 이러한 접근방법에 의하면, 일 실시예에서, 유체 장치의 구조에 있어서 내부 작동 공간 또는 유체 채널의 높이, 폭 및 형상을 정밀하게 한정할 수 있다.
- [0058] 상기 희생층은 기판 상에 형성되고, 예를 들면, 적합한 리소그래피 공정에 의해 성형되며, 천장층에 의해 커버된다. 그 후, 희생층은 습식 화학 에칭에 의해 제거되며, 바닥과 천장층 사이에 작동 갭을 형성하는 빈 공간을 남기게 되고, 상기 작동 갭은 농축기용 유동 채널 및 챔버로서 사용될 수 있다. 그러한 장치에서, 작동 갭의 수직 치수, 즉 높이는 희생층 필름의 두께에 의해 결정되는데, 희생층 필름은 정밀한 화학 증착(CVD) 기술에 의해 만들어지므로 이 치수는 매우 작을 수 있다.
- [0059] 희생층을 제거하는 데 사용되는 에칭 용액을 위한 구조 내에 수용된 희생층에 접근할 수 있도록 하기 위해, 하나 이상의 액세스 홀(access hole)을 희생층에 뚫을 수 있고, 이 홀을 통해 습식 에칭으로 희생층을 제거한다. 마감처리된 장치를 구성하는 바닥과 천장층을 수비하지 않고 희생층 내에서의 에칭이 액세스 홀로부터 측면으로 유의적 거리를 진행할 수 있도록 하기 위해서는, 희생층과 유전층(dielectric layer) 사이에 매우 높은 에칭 선

택성이 요구될 수 있다. 그러한 공정에 사용될 수 있는 물질의 조합 중 하나는 희생층용, 그리고 바닥과 천장층용으로 각각 폴리실리콘 및 질화규소이다. 매우 높은 에칭 선택성은, 일 실시예에서, 수산화칼륨(KOH), 수산화나트륨(NaOH) 또는 다른 실시예에서, 테트라메틸 암모늄 하이드록사이드(TMAH)와 같은 염기성 용액으로 얻어질 수 있다.

[0060] 또 다른 실시예에서, 상층에 뚫린 액세스 홀은 커버될 수 있다. 이를 위해서 액세스 홀을 채우도록 천장층의 상부에 이산화규소로 된 밀봉층을 적층할 수 있고, 이 부가적 박막층은 작동 갭에서의 유체의 누설 또는 증발에 대한 양호한 밀봉을 제공한다. 다른 실시예를 제시하는 SiO₂ CVD 기술은 매우 낮은 온도 산화물(VLTO) 적층과 같은 낮은 정도의 필름 정합(conformality)을 산출하는 것으로서, 액세스 홀 부근의 막힘(clogging)으로 인한 과도한 장치 면적의 상실 없이 신뢰성 있는 밀봉을 형성한다. 필요할 경우, 액세스 홀은 천장층에 있는 구멍 대신 또는 그에 추가하여, 저면층을 통해 천공될 수 있고, 추후 이산화규소의 층을 적층함으로써 재밀봉될 수 있다.

[0061] 예를 들어, 몇몇 실시예에서, 보통 질화규소 또는 이산화규소와 같은 유전체 물질인 영구적 벽 재료 및 비정질 실리콘 또는 폴리실리콘과 같은 비영구적 희생층 물질을 포함하여 장치 재료를 적층하기 위해 화학 증착법(CVD)을 이용할 수 있다.

[0062] 일 실시예에서, 마이크로채널 및 나노채널은 서로에 대해 수직으로 배향된다. 일 실시예에서, "수직인" 또는 "수직으로"라는 용어는 또 다른 채널의 길이 방향 축에 대해 90° ± 5°, 또는 다른 실시예에서 90° ± 10°, 또는 다른 실시예에서 90° ± 20° 의 각도로 배향되어 있는 것을 의미한다.

[0063] 일 실시예에서, 본 발명의 농축기의 마이크로채널과 나노채널을 연결하는 계면 영역이 구성된다. 일 실시예에서, 본 발명의 마이크로채널과 나노채널 사이에 구배 계면을 형성하기 위해 회절 구배 리소그래피(diffraction gradient lithography; DGL)가 사용된다. 일 실시예에서, 상기 구배 계면 영역은 농축기를 통과하는 유동을 조절하거나, 또 다른 실시예에서는, 전장의 강도에 반영될 수 있는, 마이크로채널에 형성된 공간 전하층, 또는 마이크로채널의 공간 전하층을 생성하는 데 필요한 전압을 조절할 수 있다.

[0064] 일 실시예에서, 구배 계면 영역은 단면 값을 μm에서 nm 길이 스케일로 좁히기 위해 측면 공간 구배 구조로 형성된다. 또 다른 실시예에서, 구배 계면 영역은 수직의 경사진 구배 구조로 형성된다. 또 다른 실시예에서, 상기 구배 구조는 측면 및 수직 구조 모두를 제공할 수 있다.

[0065] 일 실시예에서, 농축 장치는 회절 구배 리소그래피에 의해, 기판 상에 나노채널(들)과 마이크로채널(들)을 형성하고, 그 사이에 구배 계면 영역을 형성함으로써 제조될 수 있다. 상기 구배 계면 영역은, 일 실시예에서, 포토리소그래피 공정시 포토마스크 및/또는 포토레지스트 위에 위치한 블로킹 마스크를 사용함으로써 형성될 수 있다. 블로킹 마스크의 에지는 포토레지스트 상에 구배 광 강도(gradient light intensity)를 투사하는 회절을 제공한다.

[0066] 일 실시예에서, 농축기는 복수의 마이크로채널 또는 복수의 나노채널 또는 이들의 조합을 포함하는 복수의 채널을 포함할 수 있다. 일 실시예에서, "복수의 채널"이라 함은 3 채널 이상, 또는 다른 실시예에서 6 채널 이상, 또는 다른 실시예에서, 10, 96, 100, 384, 1,000, 1,536, 10,000, 100,000 또는 1,000,000 채널보다 많은 채널을 의미한다.

[0067] 일 실시예에서, 마이크로채널의 폭은 1~100μm, 또는 다른 실시예에서, 1~15μm, 또는 다른 실시예에서, 20~50μm, 또는 다른 실시예에서, 25~75μm, 또는 다른 실시예에서, 50~100μm이다. 일 실시예에서, 마이크로채널의 깊이는 0.5~50μm, 또는 다른 실시예에서, 0.5~5μm, 또는 다른 실시예에서, 5~15μm, 또는 다른 실시예에서, 10~25μm, 또는 다른 실시예에서, 15~50μm이다.

[0068] 또 다른 실시예에서, 나노채널의 폭은 1~50μm, 또는 다른 실시예에서, 1~15μm, 또는 다른 실시예에서, 10~25μm, 또는 다른 실시예에서, 15~40μm, 또는 다른 실시예에서, 25~50μm이다. 또 다른 실시예에서, 상기 나노채널의 깊이는 20~100nm, 또는 다른 실시예에서, 20~50nm, 또는 다른 실시예에서, 20~75nm, 또는 다른 실시예에서, 30~75nm, 또는 다른 실시예에서, 50~100nm이다.

[0069] 일 실시예에서, 농축기는 도 1에 도시된 바와 같이 구성된다. 폭이 5~50μm이고 깊이가 40nm인 나노채널(1-10)은 폭이 10~20μm이고 깊이가 1.5μm인 마이크로채널(1-10)에 수직으로 배향된다.

[0070] 본 발명의 또 다른 태양에서, 농축기는 마이크로채널(들)과 유체로 연통되는 하나 이상의 샘플 저장조를 추가로 포함한다. 도 1에 도시된 실시예에서, 샘플 저장조는 마이크로채널(1-30)에 근접해 있다. 또 다른

실시예에서, 샘플 저장조는 목표로 하는 종을 포함하는 유체 또는 액체를 방출할 수 있다. 일 실시예에서, 샘플 저장조는 도관에 의해 마이크로채널에 연결되어 있고, 도관은 마이크로채널의 치수를 가질 수 있으며, 또는 전술한 바와 같이 구배 계면 영역을 포함할 수 있다.

- [0071] 일 실시예에서, 목표로 하는 종을 포함하는 액체의 장치 내 도입 및 나노채널 및 마이크로채널 내 전장의 독립적인 유도에 의해 마이크로채널 내에 목표로 하는 종이 농축된다.
- [0072] 일 실시예에서, 농축기는 이하에 예시되는 바와 같이, 동전기적 트래핑을 위한 이온 고갈 영역을 생성하기 위해 이온 선택성 멤브레인으로서, 버퍼 용액이 채워진 납작한 나노유체형 필터를 이용한다.
- [0073] 일 실시예에서, 높은 유속으로 샘플 저장조로부터 마이크로채널 내에 유체를 유입시키는 마이크로채널에 생성된 비선형 전기삼투성 유동(정상 전기삼투성 유동보다 훨씬 강한 것) 때문에, 그리고 마이크로채널 내에 유도된 공간 전하층에 의해, 나노채널에 마주 대한 영역에 음이온 분자에 대한 에너지 장벽이 생성되기 때문에, 상기 장치는 하전된 부자를 효율적으로 포집한다.
- [0074] 일 실시예에서, 도 1B에 도시된 바와 같이, 2개의 분리된 전장이 농축기에 인가되어 독립적으로 제어된다. 나노유체형 채널(E_n)에서의 전장은 이온 고갈 영역 및 음이온 분자를 트래핑하는 연장된 공간 전하층을 생성한다. 애노드측에서는 마이크로유체형 채널(E_T)에서의 탄젠셜 필드(tangential field)가 전기삼투성 유동을 생성하고, 이 유동은 저장조로부터 트래핑된 영역(1-40)으로 분자를 유입시킨다.
- [0075] 일 실시예에서, 공간 전하 영역은, 예를 들면 도 7에 도시되고 이하에서 더 설명되는 바와 같이, 본 발명의 장치에서의 완충 조건을 조정함으로써 더욱 안정화된다. 일 실시예에서, 상기 장치는 나노채널에 의해 각각 연결된 2개 또는 일련의 두 마이크로채널을 포함한다. 이 실시예에 따르면, 시간이 경과함에 따라 상부 마이크로채널에서의 이온 고갈이 저부 마이크로채널에서의 이온 농후화(enrichment)로 이어지고, 그에 따라 분리 공정이 장시간 전도됨으로써 저부 마이크로유체형 채널에서의 버퍼 농도가 증가된다. 일 실시예에서, 규정된 시간 동안에 더 낮은 농도 버퍼를 제공함으로써, 또는 다른 실시예에서, 연속적으로, 전기삼투에 의해, 또는 다른 실시예에서, 더 낮은 마이크로채널에서의 압력 구동형 유동에 의해, 이 실시예에 따라 이 효과는 경감된다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 재료의 예비농축은, 예를 들면 도 8에 도시된 바와 같이, 나노유체형 채널을 마이크로채널의 양측에, 마이크로채널과 유체로 연통되도록 위치시킴으로써 증강될 수 있다. 마이크로채널과 나노채널 사이의 계면에서의 이온 고갈 개시는 나노채널을 마이크로채널의 어느 한 쪽에 위치시킴으로써 증강되고, 몇몇 실시예에서는 더 안정한 공간 전하 영역이 생성된다.
- [0077] 일 실시예에서, 상기 유동은 압력 구동에 의한 것일 수 있고, 당업자에게 잘 알려진 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 유동은 압력 구동과 동전기적 유동의 혼성일 수 있다.
- [0078] 일 실시예에서, "압력 구동형 유동"이라 함은 문제시되는 채널 세그먼트를 통해 전장을 인가함으로써 그 채널 세그먼트를 통해 생성되는 유동, 즉 본 명세서에서는 일 실시예에서 "동전기적으로 구동되는 유동"이라고 지칭되는 유동과는 대조적으로, 상기 유동이 통과하여 구동되는 채널 세그먼트의 외부에 있는 압력 소스에 의해 구동되는 유동을 의미한다.
- [0079] 압력 소스의 예로는 네거티브 및 포지티브 압력 소스 또는, 예를 들어 문제시되는 채널 세그먼트로부터 분리되어 있는 펌핑 채널에서 동전기적으로 구동되는 유동에 의해 압력을 발생하는 펌프와 같은 동전기적 압력 펌프를 포함하는, 문제시되는 채널 세그먼트 외부에 있는 펌프가 포함되며, 단 그러한 펌프는 문제시되는 채널 세그먼트에 대해 외부에 있다(참고; 미국 특허 제6,012,902호 및 제6,171,067호, 이들 특허의 내용 전체는 모든 목적에 있어서 인용되어 본 명세서에 포함됨).
- [0080] 일 실시예에서, "동전기적 유동"이라는 용어는 일반적으로, 전장이 인가된 상태에서의 유체 또는 유체에 수반된 물질의 운동을 지칭한다. 동전기적 유동은 일반적으로 전기영동, 예를 들면, 매질 또는 하전된 종이 분산되어 있는 유체를 통한 하전된 종의 운동과, 전기삼투, 예를 들면 모든 성분을 포함하는 벌크 유체의 전기적 구동 운동 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다. 따라서, 동전기적 유동과 관련하여 지칭될 때, 상정되는 것은 주도적으로 또는 실질적으로 완전히 전기영동형인 종의 운동으로부터 주로 전기삼투 방식으로 구동되는 물질의 운동(예컨대, 하전되지 않은 물질의 경우)까지의 전반적 동전기적 유동, 및 이들 극한 상태 사이에 포함되는 두 가지 형태의 동전기적 운동의 모든 범위와 비율임을 이해할 것이다.
- [0081] 일 실시예에서, "액체 유동"이라는 용어는 통로, 도관, 채널을 통하거나 또는 표면을 가로지르는 유체 또는 그 밖의 물질의 유동의 특징 중 어느 하나 또는 모두를 포괄할 수 있다. 그러한 특징으로는, 유속에 한정되지 않

고, 유동 체적, 유동하는 유체 또는 기타 물질의 형태 및 수반되는 분산 프로파일을 비롯하여, 기타 보다 일반화된 유동의 특징, 예컨대 층류(laminar flow), 크리핑 유동(creeping flow), 난류 등이 포함된다.

- [0082] 일 실시예에서, 혼성 유동은 액체 샘플의 채널 네트워크로의 압력 기반 중계(relay)에 이어지는 물질의 동전기적 운동, 또는 다른 실시예에서, 액체의 동전기적 운동에 이어지는 압력 구동형 유동을 포함할 수 있다.
- [0083] 일 실시예에서, 전장은 전압 서플라이로부터 장치로 전압을 인가함으로써 각각의 채널에서 유도될 수 있다. 일 실시예에서, 전압은 적어도 채널 중 몇몇에서 적어도 한 방향으로 전장을 인가할 수 있는, 적어도 한 쌍의 전극을 설치함으로써 인가된다. 전극 금속 컨택트는 표준 집적회로 제조 기술을 이용하여, 적어도 하나의 마이크로채널, 또는 다른 실시예에서, 적어도 하나의 나노채널, 또는 다른 실시예에서, 이들의 조합과 접촉 상태가 되도록 일체화될 수 있고, 소정의 방향을 가진 전장을 형성하도록 배향될 수 있다. 교류(AC), 직류(DC) 또는 두 가지 형태의 전장이 인가될 수 있다. 전극은 거의 모든 금속으로 제조될 수 있고, 일 실시예에서, 한정된 라인 경로 상에 적층된 얇은 Al/Au 금속층을 포함한다. 일 실시예에서, 한 전극의 적어도 일단은 저장조 내의 버퍼 용액과 접촉되어 있다.
- [0084] 또 다른 실시예에서, 농축기는 적어도 두 쌍의 전극을 수용할 수 있고, 그 각각은 상이한 방향으로 전장을 제공한다. 일 실시예에서, 필드 컨택트는 공간 전하층을 배향하거나, 다른 실시예에서, 원하는 속도 또는 방향, 또는 다른 실시예에서, 그 조합으로 마크로 분자를 이동시키도록 전장의 방향과 크기를 독립적으로 변조하는 데 사용될 수 있다.
- [0085] 일 실시예에서, 인가되는 전압은 50mV 내지 500V이다. 일 실시예에서, 전압 서플라이는 마이크로채널의 애노드측과 캐소드측에 동일한 전압을 인가하고, 또는 다른 실시예에서, 전압 서플라이는 캐소드측에 비해 상기 마이크로채널의 애노드측에 더 큰 전압을 인가한다.
- [0086] 일 실시예에서, 전압 서플라이는 원하는 전압을 제공하는 데 사용될 수 있는 임의의 전원일 수 있다. 전원은 원하는 전압을 발생할 수 있는 임의의 전기 소스일 수 있다. 예를 들면, 전원은 압전 소스(piezoelectrical source), 전지 또는 가정용 전류로 동력 공급되는 장치일 수 있다. 일 실시예에서, 가스 점화기로부터의 압전 방전(piezoelectrical discharge)이 사용될 수 있다.
- [0087] 일 실시예에서, 상기 장치에서의 동전기적 트래핑 및 샘플 포집은 수 분 동안에 걸쳐 일어날 수 있고, 또는 다른 실시예에서, 수 시간 동안 유지될 수 있다. 일 실시예에서, 소정의 시간에 걸쳐 농축은 $10^6 \sim 10^8$ 에 달하는 높은 농축 계수를 초래하고, 또 다른 실시예에서는 예를 들면 마이크로채널과 나노채널 사이의 계면, 인가되는 전압, 액체의 염 농도, 액체의 pH, 또는 이들의 조합을 조절함으로써, 농축 시 사용되는 조건을 최적화할 경우에는 훨씬 더 높을 수 있다.
- [0088] 또 다른 실시예에서, 농축기는 농축기의 마이크로채널(들), 나노채널(들)과 유체로 연통되는 하나 이상의 폐기물 저장조(waste reservoir)를 추가로 포함한다. 일 실시예에서, 상기 폐기물 저장조는 유체를 받아들일 수 있다.
- [0089] 일 실시예에서, 마이크로채널의 표면은 농축기의 표면에, 목표로 하는 종의 흡착을 감소 또는 증가시키도록 기능화될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 나노채널 및/또는 마이크로채널의 표면은 장치의 가동 효율을 증강 또는 저하시키도록 기능화되었다. 또 다른 실시예에서, 장치의 가동 효율을 증강 또는 저하시키기 위해, 장치의 기판에 외부 게이트 포텐셜이 인가된다. 또 다른 실시예에서, 상기 장치는 투명한 물질로 구성된다. 또 다른 실시예에서, 상기 투명한 물질은 파이렉스, 이산화규소, 질화규소, 석영 또는 SU-8이다.
- [0090] 또 다른 실시예에서, 상기 농축기는 목표로 하는 종의 분석이, 일 실시예에서, 농축기에서, 또는 다른 실시예에서, 농축기의 하류에서 실행될 수 있도록 되어 있다. 일 실시예에서, 농축기의 하류에서의 분석은 장치로부터 농축된 종을 제거하는 것, 그리고 적절한 분석용 장치에 위치시키는 것을 의미하고, 또 다른 실시예에서는, 농축된 물질을 적절한 분석용 장치에 중계하는, 농축기로부터의 도관을 구성하는 것을 의미한다. 일 실시예에서, 그러한 분석은 신호 획득 및 또 다른 실시예에서, 데이터 프로세서를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 신호는 광자(photon), 전류/임피던스 측정 또는 측정치의 변화일 수 있다. 이해해야 할 것은, 본 발명의 농축 장치는 그것이 갖는 단순성, 성능, 견고성 및 다른 분리 및 검출 시스템에 대한 일체화 가능성으로 인해, 생물학적 분석 마이크로시스템을 포함하는 다양한 분석 시스템에 사용될 수 있고, 그러한 시스템에 상기 장치를 일체화하는 것은 본 발명의 일부로 간주되어야 한다.
- [0091] 또 다른 실시예에서, 농축기, 또는 또 다른 실시예에서, 마이크로채널(들)은 2차원 검출기에 의해 이미지화될

수 있다. 농축기 또는 그 부품들의 이미지화는, 몇몇 실시예에서, 마이크로채널들로부터 집광하기 위한 광학적 엘리먼트와 같은, 방출된 신호를 포집하기 위한 적합한 장치에 농축기를 제시함으로써 달성될 수 있다.

[0092] 또 다른 실시예에서, 상기 장치는 분리 시스템에, 또는 다른 실시예에서, 검출 시스템에, 또는 다른 실시예에서, 분석 시스템에, 또는 다른 실시예에서, 이들의 조합에 결합된다. 또 다른 실시예에서, 상기 장치는 조명 소스에 결합된다.

[0093] 일 실시예에서, 상기 농축기는 일회용일 수 있고, 또 다른 실시예에서, 개별적으로 포장될 수 있고, 또 다른 실시예에서, 1~50,000개의 개별적 유체 샘플의 로딩 용량을 가질 수 있다. 일 실시예에서, 상기 농축기는 편리하고 상업적으로 준비된 카트리지를 또는 카세트를 제공하기 위해 플라스틱과 같은 적합한 하우징에 넣어질 수 있다. 일 실시예에서, 상기 농축기는, 예를 들면 샘플 로딩 칸막이(compartment)가 농축기에 결합되어야 하는 또 다른 장치의 조장조와 정렬되도록, 상기 장치를 삽입하고, 안내하고, 정렬하기 위한 하우징 상에, 또는 하우징 내에 적합한 형태를 가질 것이다. 예를 들면, 농축기는 삽입 슬롯(insertion slot), 트랙(track), 또는 이들의 조합을 갖추고 있을 수 있고, 또는 본 발명의 장치를 통한 농축 공정의 자동화를 위한 다른 개조물을 갖추고 있을 수 있다.

[0094] 농축기는 당업자라면 이해할 수 있는, 단백질 유전 정보학 응용에 유용한 것과 같이, 일 실시예에서, 다중 샘플의 높은 처리량의 스크리닝용으로 적응시킬 수 있다.

[0095] 일 실시예에서, 농축기는 전위차 발생기에 연결되어 있는 전극에 접촉되고, 상기 전위차 발생기는, 또 다른 실시예에서, 금속 컨택트에 접촉되어 있을 수 있다. 적합한 금속 컨택트는, 또 다른 실시예에서, 외부 스캐닝/이미징/전장 튜너에 연결될 수 있는 외부 컨택트 패치(patch)일 수 있다.

[0096] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 농축기는 채널 내부에서 분자를 여기시키고, 결과적인 신호를 검출 및 수집하기 위한 장치를 포함하는, 대형 시스템의 일부이다. 일 실시예에서, 포커싱 렌즈를 이용하여 레이저 빔을 샘플 플러그 상에 포커싱시킬 수 있다. 마이크로채널들 내부의 분자로부터 발생된 광 신호는 포커싱/집광 렌즈에 의해 포집되고, 또 다른 실시예에서, 디크로익 미러(dichroic mirror)/밴드 패스 필터(band pass filter)로부터 광학적 경로 내로 반사될 수 있고, 이것은 또 다른 실시예에서 CCD(charge coupled device) 카메라에 공급될 수 있다.

[0097] 또 다른 실시예에서, 여기(exciting) 광원은 농축기의 상부로부터 디크로익 미러/밴드 패스 필터 박스 및 포커싱/컬렉팅 스킴을 통과시킬 수 있었다. 광학적 신호를 검출하기 위해서, 디지털 카메라, PMT(photomultiplier tube) 및 APD(avalanche photodiode)와 같은 다양한 광학적 컴포넌트 및 장치를 시스템에서 사용할 수 있다.

[0098] 또 다른 실시예에서, 상기 시스템은 데이터 프로세서를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 데이터 프로세서는 CCD로부터의 신호를 처리하여 디스플레이 상에 농축된 종의 디지털 이미지로 만드는 데 이용될 수 있다. 일 실시예에서, 데이터 프로세서는 또한 상기 디지털 이미지를 분석하여, 사이즈 통계, 히스토그램, 핵형(karyotype), 매핑(mapping), 진단 정보와 같은 특성화 정보를 제공하고, 그 정보를 데이터 관독용으로 적합한 형태로 디스플레이할 수 있다.

[0099] 일 실시예에서, 상기 장치는 마이크로채널 내에 활성제를 수용하도록 추가로 변형된다. 예를 들면, 일 실시예에서, 본 발명의 방법에 따라 농축된 분자가 트래핑되는 영역에서 마이크로채널은 효소로 코팅된다. 이 태양에 따르면, 프로테아제와 같은 효소가 농축 단백질과 접촉하게 되어 농축 단백질을 소화할 수 있다. 이 태양에 따르면, 본 발명은 단백질 유전정보(proteome)를 분석하는 방법으로서, 예를 들면, 복수의 실질적으로 정제된 폴리펩티드를 얻기 위해, 복수의 세포질 폴리펩티드를 포함하는 샘플을 마이크로채널에서 농축하는 분석 방법을 제공한다. 폴리펩티드는 실질적으로 폴리펩티드를 충분히 소화할 수 있는 조건 하에서, 마이크로채널 내에 고정화된 단백질에 노출되고, 그 결과 소화 산물, 즉 펩티드를 생성한다. 상기 소화 산물은, 또 다른 실시예에서, 이어서 하류의 분리 모듈로 이송되고, 거기에서 분리되며, 또 다른 실시예에서, 분리된 소화 산물은 거기에서부터 펩티드 분석 모듈까지 운반될 수 있다. 소화 산물의 아미노산 서열은 판정되고 조합되어 폴리펩티드의 서열을 생성한다. 펩티드 분석 모듈로 운반되기 전에, 펩티드는 인터페이싱 모듈(interfacing module)로 운반될 수 있고, 인터페이싱 모듈은 부가적으로 분리, 농축 또는 포커싱 중 하나 이상의 단계를 실행할 수 있다.

[0100] 다른 실시예에서, 프로테아제는 제한되는 것은 아니지만, 아미노펩티다아제, 카르복시펩티다아제 및 엔도펩티다아제(예컨대, 트립신, 키보트립신, 테르몰리신, 엔도프로테이나아제 LysC, 엔도프로테이나아제 GluC, 엔도프로테이나아제 ArgC, 엔도프로테이나아제 AspN)과 같은 펩티다아제를 포함한다. 아미노펩티다아제 및 카르복시펩

티다아제는 번역후 개질(post-translational modification) 및 처리 이벤트(processing event)를 특징화하는데 유용하다. 프로테아제들의 조합도 사용될 수 있다. 일 실시예에서, 프로테아제 및/또는 다른 효소를 흡착 또는 공유 방법(covalent method) 방법을 이용하여 마이크로채널 표면 상에 고정화시킬 수 있다. 몇몇 실시예에서, 공유 고정화의 예로는 글루타르알데히드, 이소티오시아네이트 및 시아노겐 브로마이드와 같은 리간드로 프로테아제를 표면에 직접 공유 부착시키는 방법이 포함된다. 다른 실시예에서, 프로테아제는 프로테아제와 특이적으로 반응하거나, 프로테아제에 그 자체가 커플링되는(예를 들면 공유 방식으로) 분자와 결합 또는 반응하는 바인딩 파트너(binding partner)를 이용하여 부착될 수 있다. 바인딩 파트너는 다음을 포함할 수 있다: 시토스타틴/파페인, 말포스파네이트/카르복시펩티다아제 A, 비오틴/스트렙타비딘, 리보플라빈/리보플라빈 결합 단백질, 항원/항체 결합 쌍, 또는 이들의 조합.

- [0101] 일 실시예에서, 주어진 세포로부터 얻어진 폴리펩티드를 농축하는 단계, 소화 산물을 생성하는 단계, 및 단백질 서열을 판정하기 위해 소화 산물을 분석하는 단계는 주어진 샘플에 대해 병행하여 및/또는 반복적으로 실행될 수 있고, 폴리펩티드가 얻어진 원천인 세포의 단백질 유전정보 맵을 제공한다. 여러 가지 상이한 세포로부터의 단백질 유전 정보 맵을 비교하여 이들 세포에서 차별적으로 발현된 폴리펩티드를 식별하고, 다른 실시예에서, 상기 세포는 여러 가지로 처리, 조절되고, 또는 다양한 소스로부터 추출될 수 있고, 이렇게 해서 생성된 단백질 유전정보는 세포의 상태의 결과로서 차별적인 단백질 발현을 반영한다.
- [0102] 본 발명의 특정한 실시예에서, 농축기는 농축물을 마이크로채널로부터 폐기물 저장조로 이송하기 위한 장치를 가질 수 있다.
- [0103] 일 실시예에서, 본 발명은 현실 세계의 스크린용으로 적합한 10,000개 이상의 농축기로 스케일 증대시킬 수 있는 어레이 아키텍처(array architecture)를 제공한다.
- [0104] 일 실시예에서, 농축 효율은 이하에 예시되는 바와 같이, 알려져 있는 비율로 농축기에 도입된 표지 단백질(labeled protein) 또는 폴리펩티드를 사용하여, 농축된 표지 단백질 또는 폴리펩티드를 검출함으로써 판정될 수 있다. 신호 강도는 백그라운드 노이즈 위에서 시간의 함수로서 결정될 수 있다.
- [0105] 일 실시예에서, 본 발명의 농축기는 온도, pH, 염 농도 또는 이들의 조합을 포함할 수 있는 물리화학적 파라미터로 제어될 수 있다.
- [0106] 일 실시예에서, 나노채널은 하전된 젤 또는 랜덤 나노기공성 물질로 대체될 수 있으며, 하전된 균은 나노기공성 물질 내에 삽입된다. 일 실시예에서, 본 발명의 이 태양에 따르면, 하전된 젤 또는 나노기공성 물질은 유사한 기공 크기를 가질 수 있다. 본 발명의 이 태양에 따르면, 본 명세서에서 설명하고 예시된 바와 같이 나노채널에서 형성된 것과 유사하게 하전된 젤 또는 랜덤 나노기공성 물질에서 공간 전하층이 발생할 수 있고, 나노채널에서 유도된 것과 유사하게 상기 나노기공성 하전된 젤 또는 하전된 물질에서 전장이 유도된다.
- [0107] 일 실시예에서, 본 발명은 목표로 하는 종을 액체 중에서 농축하는 방법으로서, 본 발명의 장치를 사용하는 단계를 포함하는 농축 방법을 제공한다.
- [0108] 일 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 장치를 포함하는 마이크로유체용 펌프로서, 일 실시예에서 10 μm /초 내지 10 mm/초의 액체 유속을 가진 펌프를 제공한다.
- [0109] 일 실시예에서, 본 발명은 목표로 하는 종을 액체 중에서 농축하는 방법으로서,
- [0110] 목표로 하는 종을 포함하는 액체를 소스로부터, 나노채널에 연결된 마이크로채널을 포함하는 농축 장치에 도입하는 단계;
- [0111] 상기 나노채널 내에서 전장을 유도함으로써 상기 마이크로채널이 상기 나노채널에 연결되어 있는 영역에서 이온 고갈을 일으키고, 상기 마이크로채널 내에 공간 전하층을 형성하여 상기 목표로 하는 종에 대한 에너지 장벽을 제공하도록 하는 단계; 및
- [0112] 상기 마이크로채널 내에서 액체 유동을 유도하는 단계
- [0113] 를 포함하는 농축 방법을 제공한다.
- [0114] 일 실시예에서, 상기 유동은 전기삼투성이고, 다른 실시예에서, 상기 전기삼투성 유동은 마이크로채널 내 전장의 유도를 통해 마이크로채널 내에서 유도된다. 또 다른 실시예에서, 상기 유동은 압력에 의해 구동된다.
- [0115] 일 실시예에서, 얇은 나노유체형 채널 내에서 Debye 층 내의 반대 이온(counterion)에 의해 야기된 이온 전류의

perm-선택적 부분(perm-selective portion)은 나노채널을 통한 전체 이온 전류에 비해 무시할 수 없으며, 따라서 전장이 인가되어 애노드측으로부터 캐소드측으로 전하(반대 이온)의 순수한 이전 및 농도 분극 효과를 초래할 때(도 2), 공통 이온보다 더 많은 반대 이온(Debye 층으로부터)이 나노채널을 가로질러 이동된다. 본 발명의 이 태양에 따르면, 나노유체형 채널 부근의 이온 고갈은 Debye 층을 두껍게 하여, 나노유체형 채널에서 더 심하게 중첩시키고, 농도 분극 효과를 가속화하며, 이하에서 더 설명하는 바와 같이 특정한 문턱 E_n 값을 초과하여 2차 반응속도(second order kinetics)를 가진 전기삼투를 초래한다.

- [0116] 본 발명의 이 태양에 따르면, 나노유체형 채널로부터의 반대 이온 고갈 및 마이크로채널 내부의 벌크 용액 내 연장된 공간 전하층의 생성은 이 영역에서의 공동 이온 이동을 방지한다. 일 실시예에서, 두 힘(공간 전하층으로부터의 음이온 반달 대비 저장조로부터의 비선형 전기삼투 유동)의 균형을 잡기 위한 전장(E_n 및 E_T)의 제어는 계면을 안정화하며, 계면은 본 발명의 이 태양에 따라, 목표로 하는 음이온 종이 트래핑되고 포집되는 곳이다.
- [0117] 일 실시예에서, 마이크로채널의 애노드측과 캐소드측에 동일한 전압이 인가되고, 또 다른 실시예에서는 마이크로채널의 캐소드측에 비해 애노드측에 더 높은 전압이 인가된다. 또 다른 실시예에서, 상기 마이크로채널의 애노드측에 더 높은 전압을 인가하기 전에 마이크로채널에 공간 전하층이 발생된다.
- [0118] 일 실시예에서, 상기 액체는 용액이다. 또 다른 실시예에서, 상기 액체는 현탁액이며, 이것은 또 다른 실시예에서 유기 호모제네이트, 세포 추출물 또는 혈액 샘플이다. 일 실시예에서, 목표로 하는 종은 단백질, 폴리펩티드, 핵산, 바이러스 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시예에서, 목표로 하는 종은 세포에서 발견되거나 세포로부터 분비된 단백질, 핵산, 바이러스 또는 바이러스 입자이고, 또 다른 실시예에서는, 예를 들면 세포의 단백질 추출물로부터 추출된 단백질의 10% 미만을 나타내는 매우 적은 양으로 발견된다.
- [0119] 일 실시예에서, 본 발명의 방법 및 장치는 비교적 큰 샘플 체적(약 $1\mu\text{l}$ 이상)으로부터 분자를 포집하고, 그것을 적은 체적($1\text{pL} \sim 1\text{nL}$)으로 농축하는 것을 가능하게 한다. 그러한 농축된 샘플은 이어서, 다른 실시예에서, 다양한 마이크로유체형 시스템에 의해 마이크로유체형 생체분자 분류(sorting)/검출 시스템의 적은 샘플 체적 용량에 의해 야기되는 전반적 검출 민감도의 희생 없이 효율적으로 분류되거나 분리되거나 검출될 수 있다.
- [0120] 일 실시예에서, 본 발명의 농축 방법 및 장치는, 유의적으로 증가된 분자의 신호 강도 및 계속되는 올바른 검출을 가능하게 하고, 이것은 또 다른 실시예에서, 미량의 단백질 또는 펩티드와 같은 미소한 농도에서의 분자의 검출 가능성을 희생하지 않으면서, 보다 공격적인 분자 분류 및/또는 샘플로부터 단백질과 같은 매우 다량의 분자의 제거를 가능하게 한다.
- [0121] 또 다른 실시예에서, 본 발명의 농축 장치 및 방법은 여러 개의 미표지(non-labeling) 검출 기법(예컨대, UV 흡수)의 사용을 가능하게 하는데, 이것은 종래의 마이크로유체형 채널의 짧은 길이의 경로 및 적은 내부 체적으로 인해 과거에는 불가능했다. 따라서, 또 다른 실시예에서, 농도와 분자 분류를 결합시키는 본 발명의 농축 장치 및 방법은 바이오마커(biomarker) 검출, 환경 분석 및 화학적-생물학적 반응제 검출을 위한 집적된 마이크로시스템에 대한 이상적 기반(platform)을 제공할 수 있다.
- [0122] 일 실시예에서, 본 발명의 방법은 목표로 하는 종을 장치로부터 방출하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 목표로 하는 종을 모세관 전기영동 처리하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0123] 모세관 전기영동은 샘플 성분들을 분리하기 위해 분자의 전기영동 특성 및/또는 작은 모세관 내 샘플의 전기삼투성 유동을 활용하는 기법이다. 전형적으로, 내경이 $100\mu\text{m}$ 이하인 용융 실리카 모세관은 전해질을 함유하는 버퍼 용액으로 채워진다. 모세관의 각 단부는 버퍼 전해질을 수용하는 분리된 유체 저장조 내에 위치한다. 버퍼 저장조 중 하나에 포텐셜 전압이 놓이고, 다른 버퍼 저장조에 제2 포텐셜 전압이 놓인다. 포지티브로 하전된 중 및 네거티브로 하전된 종은, 버퍼 저장조에 인가된 두 포텐셜 전압에 의해 형성된 전장의 영향을 받아 모세관을 통해 반대 방향으로 이동하게 된다. 유체의 각 성분의 전기삼투성 유동과 전기영동형 이동도(mobility)는 각 유체 성분에 대한 전반적 이동을 결정한다. 전기삼투성 유동으로 초래되는 유체 유동 프로파일은 분리 채널의 벽을 따라 마찰 드래그(frictional drag)의 감소로 인해 납작하다. 관찰되는 이동도는 전기삼투성 및 전기영동성 이동도의 합이며, 관찰되는 속도는 전기삼투성 및 전기영동성 속도의 합이다.
- [0124] 본 발명의 일 실시예에서, 모세관 전기영동 시스템은 장치 상에서 마이크로가공되고(micromachined), 이것은 본 명세서에 기재된 농축 장치의 일부 또는 그로부터 분리된 것이다. 장치 상에 모세관 전기영동 시스템을 마이크로가공하는 방법은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면 하기 문헌에 기재되어 있다: 미국 특허 제 6,274,089호; 미국 특허 제6,271,021호; Effenhauser et al., 1993, Anal. Chem. 65: 2637-2642; harrison et al., 1993, Science 261: 895-897; Jacobson et al., 1994, Anal. Chem. 66: 1107-1113; 및 Jacobson et al.,

1994, Anal. Chem. 66: 1114-1118.

- [0125] 일 실시예에서, 모세관 전기영동 분리는, 이어서 MALDI-MS 및/또는 ESI-MS/MS 기반 단백질 분석 모두에 사용될 수 있다(참고 문헌예; Feng et al., 2000, Journal of the American Society For Mass Spectrometry 11: 94-99; Koziel, New Orleans La. 2000; Khandurina et al., 1999, analytical Chemistry 71: 1815-1819).
- [0126] 다른 실시예에서, 본 발명의 농축기와 계면을 이룰 수 있는 분리 장치의 하류는, 제한되지는 않지만, 예를 들면 역상(reverse-phase), 이온교환 및 친화성 컬럼(affinity column)과 같은, 마이크로 고성능 액체 크로마토그래피 컬럼을 포함한다.
- [0127] 상기 농축 장치의 하류에 결합되어 있는 일체의 시스템, 장치 등의 정확한 구성은 본 발명의 일부로 간주되어야 하고, 상기 구성은 원하는 응용에 적합하도록 변동될 수 있음을 이해해야 한다. 일 실시예에서, 농축된 펩티드의 분리를 위해 농축 장치의 하류에 위치한 모듈은 분리 매체 및 양단부 사이에 전장이 인가되는 모세관을 포함한다. 모세관 시스템 내 분리 매체의 이송 및 테스트할 샘플(예를 들면, 펩티드 및/또는 부분 소화된 폴리펩티드를 포함하는 샘플 밴드)의 분리 매체로의 주입은 펌프와 밸브의 보조 하에, 또는 다른 실시예에서는 모세관의 다양한 지점에서 인가되는 전장을 통해 수행될 수 있다.
- [0128] 또 다른 실시예에서, 상기 방법은 목표로 하는 종이 검출 한계 미만의 농도로 액중에 존재할 때, 상기 목표로 하는 종을 검출하는 데 활용된다.
- [0129] 이하에서 예시되는 바와 같이(도 3), 형광 현미경으로 모니터했을 때, 장치 내에 로딩되는 33 pM 그린 형광 단백질(GFP)의 용액은 검출 한계 미만이다. 전술한 용액의 농도는 33 pM GFP의 검출을 가능하게 하며, 33 fM에 불과한 훨씬 희박한 GFP 단백질 용액의 농도는 약 3시간에 걸쳐 모니터했을 때, 계수 $10^6 \sim 10^8$ 의 농도로 얻어졌다.
- [0130] 일 실시예에서, 농축 속도는 신속하다. 이하에 예시되는 바와 같이, GFP 용액의 10^7 배 농도가 1시간 이내에 얻어졌다. 농축된 플러그의 대략적 체적이 약 0.5 pL ($\sim 1.5\mu\text{m} \times 20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$)이기 때문에, 농축 장치는 채널을 통해 $1\mu\text{l}$ 만큼 많은 체적의 샘플 액을 펌핑하고 그 체적 내에 GFP를 트래킹했다. 이 실험에서 농축 시간을 $\sim 10^4$ 초라 하면, 평균 샘플 유속은 1mm/초에 달할 만큼 높을 것이다.
- [0131] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 시스템 내에서 액체 유동을 제어하는 방법으로서,
- [0132] 하전된 종 또는 양쪽성 종을 포함하는 상기 액체를 소스로부터, 나노채널에 연결된 마이크로채널을 포함하는 상기 시스템 내의 펌핑 장치에 도입하는 단계;
- [0133] 상기 나노채널 내에서 전장을 유도함으로써 상기 마이크로채널이 상기 나노채널에 연결되어 있는 영역에서 이온 고갈을 일으키고, 상기 마이크로채널 내에 공간 전하층을 형성하여 상기 목표로 하는 종에 대한 에너지 장벽을 제공하도록 하는 단계; 및
- [0134] 상기 마이크로채널 내에서 전장을 유도함으로써 상기 마이크로채널 내에 전기삼투성 유동을 유도하고, 상기 유동은 상기 액체를 상기 장치 내로 추가로 도입하고, 상기 유동은 상기 전장의 강도에 의해 제어되도록 하는 단계
- [0135] 를 포함하는 제어 방법을 제공한다.
- [0136] 액체 유동의 제어는 당업자라면 이해하는 바와 같이, 광범위한 분야에서 다양하게 적용된다. 일 실시예에서, 액체 유동을 제어하는 방법, 및/또는 목표로 하는 종을 농축하는 방법은 바이오센서(biosensor) 장치에 유용할 수 있다. 일 실시예에서, 액체 유동의 제어는 바이오센서에서 필수적이고, 여기서 마이크로유체형 시스템의 저장조에 대해 출입하는 샘플 및 다양한 반응제의 유동 및 혼합이 요구된다. 또 다른 실시예에서, 검출하고자 하는 미량의 목표로 하는 종의 농도는 바이오센서 장치의 중요한 요소이다. 일 실시예에서, 상기 방법은 잠복 상태 또는 포자 상태에 있는 유기체(organism)의 검출에 있어서 특히 유용하며, 그러한 유기체의 검출은 다른 방법으로는 어렵다.
- [0137] 다른 실시예에서, 본 발명으로부터 이탈하지 않고 본 발명의 방법을 다양하게 적용할 수 있다. 예를 들어, 유체 유동을 제어하는 방법에 있어서, 유체 유동이 중앙 저장조로 향하도록 다중 마이크로채널을 적층할 수 있고, 중앙 저장조로 부가적 마이크로채널을 연결할 수 있다. 이 태양에 따르면, 유체가 일단 저장조 내에 유입되면 혼합될 수 있고, 이어서 제2 세트의 마이크로채널을 통해 추가적 조작을 위해 연결되어 있는 또 다른 저장조에

펌핑될 수 있다. 본 발명의 펌핑 방법은 물 및 생물학적 유체를 포함하는 다양한 형태의 유체에 의해 작동된다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

[0138] 예로서, 본 발명의 농축 및 펌핑 방법에 의하면 높은 처리량의 로봇 사용 분석 시스템이 본 발명의 장치와 직접 연결될 수 있고, 또한 목표로 하는 종의 농축 및/또는 액체의 펌핑이 가능하다.

[0139] 본 발명을 수행하는 다양한 방식은, 본 발명으로서 간주되는 대상을 특별히 지적하고 명백히 청구하고 있는 이하의 청구의 범위에 포함된다.

[0140] **실시예**

[0141] **재료 및 방법:**

[0142] **장치의 제조:**

[0143] 제조 기법은 문헌에 기재된 바와 같았다(J. Han, H.G. Craighead, J. Vac. Sci. Technol., A 17, 2142-2147 (1999); J. Han, H.G. craighead, Science 288, 1026-1029 (2000)). 2회의 반응성 이온 에칭을 사용했다. 표준 리소그래피 기구로 포 5~20 μ m의 나노채널을 패터닝한 후, 제1 반응성 이온 에칭(RIE)을 약 10초 동안 실행하여 40nm 나노채널을 에칭하고, 제2 에칭에 의해 나노필터를 가로질러 2개의 평행한 1.5 μ m 마이크로유체형 채널을 생성했다. 퍼버 농도 및 채널 깊이의 효과를 입증하기 위해 깊이가 30~70nm인 나노필터를 제조했다. RIE 에칭이 완결된 후, 로딩 홀을 통해 에칭하기 위해 KOH 에칭을 행했다. 질화물 스트리핑에 이어서 열적 산화를 행하여 적절한 전기 절연성을 제공했다. 이어서, 표준 애노드 집합 기법을 사용하여 장치의 저면을 파이렉스 웨이퍼로 접합시켰다.

[0144] **생체분자 및 반응제 제조**

[0145] pH 9.1에서 10mM 인산염 버퍼(2염기성 인산나트륨)를 주로 사용하고, 박테리아 성장을 방지하기 위해 10 μ M EDTA로 보충했다. pH 4.6 및 10mM 인산염 버퍼의 조건 하에서 성공적인 예비농축이 입증되었다. 10mM의 pH 3.5 아세트이트 버퍼 및 1X TBE 버퍼(~80mM)의 조건은 유의적인 예비농축 효과가 없었다.

[0146] 10mM 인산염 버퍼의 조건 하에서, 50nm보다 큰 깊이를 가진 채널에서 분극 효과가 관찰되지 않았는데, 이는 낮은 pH(표면 이온화를 억제함) 또는 너무 높은 버퍼 이온 강도(짧은 Debye 길이로 인해 나노필터가 펌-선택성이 적게 되는 경우) 때문인 것으로 추정된다.

[0147] 사용된 분자 및 염료는 다음을 포함한다: rGFP(BD bioscience, Palo Alto, CA), FITC-BSA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), FITC-Ovalbumin(Molecular Probes, Eugene, OR), FITC-BSA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), FITC 염료(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Mito Orange(Molecular Probes, Eugene, OR), 및 lambda-DNA(500 μ g/ml). DNA 분자는 제조자 지침에 따라 YOYO-1 층간삽입(intercalating) 염료(Molecular Probes, Eugene, OR)로 표지되었다.

[0148] 또한, NH₂-GCEHH-COOH(SEQ ID NO: 1)(pI 4.08) 펩티드 분자를 massachusetts Institute of Technology의 Biopolymers Laboratory에서 합성하고, 다음과 같은 절차에 의해 티올-결합 염료로 표지했다: HPLC 정제된 펩티드 샘플을 우선 모액(stock solution)으로서 10mM 펩티드 농축 용액(0.1M pH 7.4 인산염 버퍼)으로 재구성한 다음, 1mM로 희석시켰다. 희석된 모액을 1:1 비율로 10mM TCEP(Molecular Probes, Eugene, OR) 및 5-TMR1A 염료(Molecular Probes, Eugene, OR)와 혼합했다. 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 차광한 상태에서 반응을 진행시킨 다음, 미반응 염료는 100mM 머캅토에탄올(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 첨가함으로써 종결시키고, 1 kDa 컷-오프를 구비한 미니 투석 키트(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)를 사용하여 투석시켰다.

[0149] **광학적 검출 장치**

[0150] 모든 실험은 형광 여기 광원이 부착된 반전 현미경(IX-71)을 사용하여 수행되었다. 형광 이미징을 위해 열전기적으로 냉각된 CCD 카메라(Cooke Co., Auburn Hill, MI)를 사용했다. IPLab 3.6(Scanalytics, Fairfax, VA)로 연속된 화상을 분석했다. 상이한 포텐셜을 저장조에 분배하기 위해 손으로 만든 분압기를 사용했다. 광원으로는 내장된 100W 수은등을 사용했으며, 중간 밀도 필터(neutral density filter)를 사용하여 광의 세기를 감소시키고 검출의 동적 범위를 증가시켰다.

[0151] **분자 농도의 정량화**

[0152] 채널 내 분자 농도의 정량화를 도 X에 도시한다. 상기 장치는 검출용으로 사용되는 CCD 어레이를 포화시키는

샘플 플러그를 생성할 수 있기 때문에, 여기 광 세기를 감소시키기 위해, 적어도 12% 투과를 허용하는 중간 밀도 필터(Olympus (32ND12))를 70% NA 개구(50% 투과)로 하여 사용했다. 광 세기를 0.6%로 감소시킴으로써 검출기의 동적 범위는 증가된 반면, 광표백(photobleaching)은 감소되었다.

[0153] 채널은 3.3 μM 및 0.33 μM GFP 용액으로 채웠고, 채널 내 용액으로부터의 형광 신호를 측정했다. 카메라 셔터는 포집된 분자의 광표백을 최소화하기 위해 주기적 노출(~1초) 동안에만 열었다.

[0154] 단백질의 비특이적 결합(non-specific binding)을 방지하기 위해, 각 실험 이전 및 실험 후, 이월 효과(carryover effect)를 배제하기 위해 새로 제조되고 충전된 장치를 사용하는 것에 더하여, 형광성 단백질이 비특이적으로 벽에 결합함으로써 인해 잔류 형광성을 완전히 불식시키기에 충분한 시간 동안 칩을 레이저에 노출시켰다.

[0155] **코팅된 채널에서의 예비농축**

[0156] 미반응 실리카 표면 상에 샘플이 흡착되는 것을 방지하기 위해, 표준 폴리아크릴아미드 코팅(S. Hjerten, J. Chromatogr. 347, 191-198(1985))을 도포했다. 집착 촉진제로서 3-(트리메톡시실릴)프로필 메타크릴레이트로 장치를 코팅했다. 그런 다음, 5% 폴리아크릴아미드 용액을 0.2% VA-086 광개시제(WAKO, Richmond, VA)와 혼합하고, UV 램프 하에서 5분간 노출시켜 중합이 개시되도록 했다. 상기 코팅 후, 장치에 대해 눈에 뵈는 정도의 흡착은 없었다. 폴리아크릴아미드 코팅 공정이 표면 포텐셜 및 표면 전하 밀도를 감소시킬 것으로 예상됐지만, 더 높은 조작 포텐셜을 인가함으로써 유사한 전하 분극 및 샘플 트래핑 패턴이 관찰되었다(효율은 상대적으로 낮았지만). 낮은 효율은 훨씬 더 낮은 버퍼 이온 강도를 채택함으로써 극복되었다.

[0157] **다양한 버퍼 조건에서의 예비농축**

[0158] 여러 가지 버퍼 조건에 대한 상기 장치의 적응성을 입증하기 위해, 여러 가지 pH(5~9), 여러 가지 버퍼 용액 및 여러 가지 이온 강도에서 버퍼 농도를 평가했다. 또한, 전형적인 단백질 유전 정보학 연구 환경에서와 같이, 직접 장치에서의 젤 전기영동으로부터 바이오샘플을 사용하여 시뮬레이션하여, 환원, 알킬화, 트립신화(trypsinization) 및 펩티드 분리를 실행한 후, 폴리아크릴아미드 젤 슬라이드로부터 직접 유래되는 추출 용액을 사용하여, 상기 장치의 가동을 시험했다. 상기 추출 용액은 단백질을 함유하지 않았지만, 샘플 또는 전기영동 버퍼(트리스, 글리신, 소듐 도데실 설페이트, 글리세롤, 디티오프레이트, 가능한 케라틴 오염물)로부터, 염색(Coomassie blue)으로부터, 및/또는 환원 및 알킬화 단계(트리스(2-카르복시-에틸)-포스핀 하이드로클로라이드, 요오도아세트아미드, 중탄산암모늄)로부터의 젤에는 소량의 염 및 작은 분자들이 존재했었을 수 있다. 20% 포르산 20 μl로 효소 불활성화를 행한 다음, 트립신화 용액(60 μl; 중탄산암모늄 버퍼 중 10ng/μl 트립신 및/또는 트립신 펩티드)에 대해 소니케이션(sonication)에 의한 추출을 실행했다. 이 추출 용액을 포집하고 스피드백(speedvac)에서 농축했다. 소니케이션에 의한 추출은 순차적으로, 100mM 중탄산암모늄 200 μl, 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA) 수용액, 50:50 물과 아세트오닐릴 용매 중 0.1% TFA 2회를 사용하여 실행되었다. 매번 추출된 용액을 포집하고, 선행 단계로부터 추출된 용액과 합치고, 스피드백에서 약 10 μl가 되도록 농축했다. 그런 다음, 이 복합 용액을 표지된 GFP 분자를 첨가함으로써 '샘플 버퍼'로서 사용했다. 상기 예비농축 단계에 있어서, 이 시뮬레이션된 샘플 용액을 10mM 인산염 버퍼(1:9 비율)로 희석하고, 채널 내에 로딩했다.

[0159] **실시예 1**

[0160] **전기삼투 및 동전기적 트래핑을 통한 하전된 종의 농축**

[0161] 생체분자는 장치에서 효율적으로 농축되고, 장치의 채널에서 생성된 비선형 전기삼투성 유동(정상적 전기삼투성 유동보다 훨씬 강함)을 제공하고, 높은 유속으로 생체분자를 "트래핑 영역"으로 운반함과 아울러, 장치 내의 유도된 공간 전하층에 의해 생성된 분자에 대한 에너지 장벽을 제공한다. 이러한 두 현상의 결합은 장치의 마이크로유체형 채널 내에서 물리적 장벽 또는 반응제 없이, 10⁶~10⁸배 이하의 농도로, 하전된 생체분자, 예를 들면 단백질 및 펩티드의 신속한 농축을 가능하게 한다.

[0162] 상기 장치의 일 실시예를 도 1A 및 1B에 개략적으로 도시한다. 두께가 전형적으로 50nm 미만인 하나 이상의 얇은 나노유체형 채널(1-10)은 2개 이상의 마이크로유체형 채널(1-20)을 연결한다. 도 1B에 나타난 바와 같이, 2개의 분리된 전장이 장치에 인가되고, 독립적으로 제어된다. 나노유체형 채널(E_n)에서의 전장은 이온 고갈 영역 및 음이온성 생체분자를 트래핑하는 연장된 공간 전하층을 생성하기 위해 사용된다. 마이크로유체형 채널(E_T)에서는 애노드측에 유도된 탄젠셜 필드는 전기삼투성 유동을 생성하여, 분자를 저장조(1-30)로부터 트래핑된 영역

(1-40) 내로 운반한다.

- [0163] 상기 장치의 또 다른 실시예가 도 2에 개략적으로 도시되어 있다. 나노유체형 채널(2-10)은 2개의 마이크로유체형 채널(2-20)을 연결한다. 도시된 바와 같이 전극(2-30)에 의해 전장이 상기 장치에 인가된다. 나노유체형 채널(E_n)에서의 전장은 이온 고갈 영역 및 음이온성 생체분자를 트래핑하는 연장된 공간 전하층을 생성하기 위해 사용된다. 마이크로유체형 채널(E_T)에서는 애노드측에 유도된 탄젠셜 필드는 전기삼투성 유동을 생성하여, 분자를 샘플 저장조(2-40)로부터 마이크로채널의 트래핑된 영역 내로 운반한다. 샘플 저장조는 유체 내에 현탁되거나 가용화된 샘플을 함유하지 않는다. 마이크로채널과 접촉되어 있는 버퍼를 구비한 다른 용기들(2-50)이 도면에 도시되어 있는데, 그 중 몇몇은 본 명세서에서 설명한 바와 같이 폐기물 저장조, 포집 수단 등으로서 기능한다.
- [0164] 상기 장치는 전술한 바와 같이, 표준 포토리소그래피 및 반응성 이온 에칭 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 나노유체형 채널 구조의 두께 및 균일성은 주사 전자현미경에 의해 체크되었고, 사용된 제조 기법으로 채널의 유의적 변형 또는 붕괴를 일으키지 않고(데이터는 제시되지 않음), 20nm로 얇은 나노유체형 채널이 생성되었다.
- [0165] 나노유체형 채널(두께; 약 50nm)은 이온교환 멤브레인에서 일어나는 것과 유사한 펌-선택적 이온 전류를 지지할 수 있다. 그러한 얇은 나노유체형 채널 내에서는 Debye 층 내의 반대 이온에 의해 야기된 이온 전류의 펌-선택적 부분은 나노채널을 통한 전체 이온 전류에 비해 무시할 수 없다. 따라서, 전장이 인가될 때, 공통 이온보다 더 많은 반대 이온(Debye 층으로부터)이 나노채널을 가로질러 이동할 것이다(도 3A). 이것은 애노드측으로부터 캐소드측으로의 전하(반대 이온)의 순수한 이동을 초래하며, 전체적 이온 농도는 농도 분극 효과로 인해 캐소드측에서 감소될 것이다(도 3B).
- [0166] 나노유체형 채널 근방의 이온 고갈(농도 분극에 의해 야기됨)은 Debye 층을 더 두껍게 하고 나노유체형 채널에서 더욱 현저히 중첩시킴으로써, 농도 분극을 가속화한다. 소정의 E_n 문턱값 이상에서, 채널을 가로지르는 이온 이송은 새로운 비선형 상황(non-linear regime)에 들어가며(제2종의 동전기학), 이것은 앞서서 이온교환 멤브레인에서 보고된 바 있다. 이 상황에서(도 3C), 반대 이온은 나노유체형 채널로부터 고갈되고, 이 경우 마이크로유체형 채널 내부의 벌크 용액에서 연장된 공간 전하층(유도된 전기적 이중층)이 형성될 것이다. 이 유도된 전기적 이중층 내에서, 전기적 중성(electroneutrality)은 국소적으로 파괴되고(이들 전하는 나노채널 내 고정된 표면 전하를 스크린함), Debye 층에서와 동일하게 그것이 가진 네거티브 포텐셜로 인해 이 영역으로부터 공동 이온(생체분자)이 금지된다.
- [0167] 상기 유도된 이동형 이온층은 전장의 탄젠셜 성분(E_T)이 인가될 때 강한 전기삼투성 유동을 발생할 수 있다(도 3D). 전장(E_n 및 E_T)을 주의 깊게 제어함으로써, 두 힘(공간 전하층으로부터의 음이온 반발 대비 저장조로부터의 비선형 전기삼투성 유동)의 균형을 맞추어, 계면을 안정화시킬 수 있다. 이 계면은 음이온 생체분자가 트래핑되고 포집되는 곳이다.
- [0168] 비선형 전기삼투성 유동은 전장의 비선형 함수(이 경우 $\sim E_n E_n$)인 유속을 가진다. 정상 전기삼투성 유동(표면 Debye 층 전하에 의해 야기됨)에 비해 훨씬 강한 전기삼투성 유속이 발생할 수 있다(전형적으로 10~100배 더 빠름). 하전된 멤브레인 비즈를 사용하는 다른 경우는 제2종의 전기삼투의 발생을 나타냈지만, 그러한 유동은 강하지만 멤브레인 부근에서 제어할 수 없는 유동 와류(vortex)를 생성하고, 이것은 빠른 혼합에 사용되었다. 연장된 공간 전하층은 불안정하고, 비-평형 상태이며, 그러한 시스템에서 무질서하거나 진동형(oscillatory) 이온 수송 행태를 제공한다.
- [0169] 종래의 보고 내용과 대조적으로, 여기서 언급하는 전기삼투는 발생하는 고체상태 나노유체형 전하-선택적 계면의 안정성으로 인해 양호하게 제어되었으며, 이는 또한 농축의 효율에 기여했다.
- [0170] **실시예 2**
- [0171] **전기삼투 및 동전기적 트래핑을 통한 단백질의 농축**
- [0172] 도 4는 채널에서의 분자 농축의 정량화에 사용되는 절차를 나타낸다. 예시된 장치는 검출용으로 사용된 CCD 어레이를 포화시키는 샘플 플러그를 발생시킬 수 있으며, 따라서 중간 밀도 필터가 사용될 수 있다. 포집된 GFP 단백질 플러스의 농도는 채널 내 분자로부터의 형광 신호를 측정함으로써 추정되었다. 3.3 μM 및 0.33 μM GFP 용액으로 충전된 채널로는 0.33 μM GFP 용액을 거의 검출할 수 없었다(도 4C). 두 가지 강도 레벨을 분자의 예비 농축 후 국소적 강도 레벨과 비교했다(도 4D).

- [0173] 도 5는 예시된 장치의 안정성 및 성능을 나타낸다. 도 5(A-C)에서, 33pM GFP(그린 형광성 단백질)의 용액을 샘플 저장조 내에 로딩하고, 얻어지는 트래핑된 단백질 피크를 형광 현미경에 의해 모니터링했다. 단백질 농도는 연장된 시간(수 시간) 동안 안정한 상태로 유지되었으며, 이에 따라 1백만보다 큰 계수의 농축이 가능했다. 도 5D 및 5E는 약 3시간에 걸쳐 모니터링한, 33nM, 33pM 및 33fM으로 희석된 GFP 단백질 용액의 농도를 나타낸다. 예시된 장치에서 $10^6 \sim 10^8$ 의 계수에 달하는 단백질의 농축이 달성되었다. 플러그 농도가 높을 때($\sim 1 \mu\text{M}$) 포집 속도는 감소되었는데, 이는 채널 표면 상 단백질의 과도한 비특이적 결합에 기인하는 것으로 추측된다.
- [0174] 예시된 장치에서의 농축 속도는 높았다. 1시간 이내에 10^7 배의 농축이 달성되었다. 농축된 플러그의 대략적 체적이 약 $0.5 \text{ pL} (\sim 1.5 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m})$ 이기 때문에, 이는 예시된 장치가 채널을 통해 $1 \mu\text{l}$ 만큼 많은 체적의 샘플 액을 펌핑했으며 그 체적 내에 GFP를 트래핑했음을 의미한다. 이 실험에서 $\sim 10^4$ 초의 농축 시간이 주어졌을 때, 평균 샘플 유속은 1 mm/초 에 달할 정도로 높아야 하는데, 이 값은 이 실험에서 사용된 전장($\sim 10 \text{ V/cm}$)으로는 겨우 $10 \sim 100 \mu\text{m/초}$ 를 발생하는 정상적 전기삼투성 유동(1차)에 의해서 얻을 수 없다. 빠른 포집(및 빠른 샘플 유체 펌핑)은 2차 반응 속도를 가진 전기삼투의 발생에 의해서만 설명될 수 있다. 유도된 공간 전하는 전장(E_n)에 의해 마이크로채널 내에서 발생되고, 탄젠셜 필드(E_T)는 이러한 유도된 공간 전하는 캐소드 저장조 방향으로 이동시킨다. 따라서, 본 명세서에서의 예비농축기는 분자를 트래핑할 뿐 아니라, 샘플 액도 매우 효율적으로 펌핑한다. 샘플 농축에 부가하여, 예시된 장치는 마이크로유체형 펌핑 장치로서의 역할을 할 수 있는데, 이는 전기삼투성(동전기적) 펌핑보다 훨씬 효율적이며, AC 동전기적 펌핑보다 실행하기가 더 간단하다.
- [0175] 예시된 장치를 사용하여 생체분자 농축을 위해 평가된 다른 조건들로는 사용된 버퍼의 이온 강도의 변경이 포함된다. 버퍼의 이온 강도가 감소되면 예비농축 효율이 향상되지만, 그것은 10 mM 인산염 버퍼 조건에서도 가동될 수 있다.
- [0176] 또한, 나노유체형 채널 두께 및/또는 버퍼 이온 강도 또는 조성의 변동을 평가했다. 일반적으로, 나노유체형 채널 두께의 증가는 예시된 장치의 가동에 요구되는 버퍼 이온 강도에 반비례한다.
- [0177] 또한, 주어진 장치에서 나노필터의 크기 및 개수의 변동은, 시스템 내의 상이한 전장 분포로 인해 장치의 농축 효율에 영향을 준다.
- [0178] 예시된 장치에 대해, 용액 중의 단백질(도 4), 합성 펩티드(도 5), 형광 염료, 및 형광 비즈를 농축하는 장치의 능력을 테스트했다(데이터는 제시되지 않음). 또한, 생체분자의 비특이적 결합을 방지하기 위해 장치 표면을 폴리아크릴아미드 폴리머로 코팅했을 때, 장치 가동을 테스트했다. 모든 경우에, 농축 속도를 적용되는 여러 가지 조건의 함수로서 변동시킴으로써 분자 트래핑을 완수했다.
- [0179] 이것은 집적화를 가중시키는 데 있어서, 장치가 갖는 융통성 및 적응성을 명확히 입증한다. 젤 전기영동의 젤 내 소화(in-gel digestion)로부터 직접 얻어진 복합 용액(높은 이온 강도를 가지며 약간의 유기 용매를 함유)일 지라도, 10 mM 의 인산염 버퍼 중에 희석된 후 사용될 수 있다. 이는 예비농축 장치에서 젤 전기영동 또는 다른 종래의 정제 기술(높은 이온 강도 버퍼를 사용)로부터 직접 샘플을 사용하는 가능성을 열어 주는 것이다.
- [0180] **실시예 3**
- [0181] **전기삼투 및 동전기적 트래핑을 통해 농축된 단백질의 분석**
- [0182] 예시된 장치에서의 분자 트래핑은 E_n 을 제거함으로써 중지될 수 있다. 버퍼 용액은 전장이 소거되는 즉시 이온 밸런스를 회복하는 것으로 예상된다. 전장이 소거되면, 포집된 피크는 즉각적으로 원래의 피크 폭의 약 2배로 분산되지만, 더 이상의 분산은 관찰되지 않는다. 따라서, 예시된 장치에 의해 발생하는 분자 플러그는 전장(전기영동) 또는 압력 구동형 유동에 의해 용이하게 조작될 수 있다. 도 6은 예시된 장치에 의해 포집된 두 가지 단백질 종의 모세관 전기영동을 나타낸다. 그 결과는 예시된 장치 및 하류의 분석 기구, 이 경우 자유 용액(free solution) 모세관 전기영동의 효과적인 커플링을 나타낸다.
- [0183] **실시예 4**
- [0184] **버퍼 조건의 조작은 공간 전하 영역의 안정성을 증가시킴**
- [0185] 본 발명의 장치에서 버퍼 조건을 조작함으로써 공간 전하 영역을 더욱 안정화시킬 수 있다(도 7). 일 실시예에서, 둘 또는 일련의 2 마이크로채널을 포함하는 장치가 나노채널에 의해 연결된다. 이 실시예에 따르면, 시간이 경과함에 따라, 상부 마이크로채널(7-10)에서의 이온 고갈이 저부 마이크로채널(7-20)에서의 이온 농후화로

이끌며, 따라서 저부 마이크로유체형 채널에서의 버퍼 농도는 분리 공정의 장시간 전도와 함께 증가된다. 일 실시예에서, 특히 나노채널(7-30)에 가장 근접한 섹션이 영향을 받는다. 시간이 지나면, 나노유체형 채널의 이온 선택성은 약해질 수 있고, 상부 채널에서의 불안정한 고갈이 초래될 수 있다. 그러나, 일 실시예에서, 소정의 시간 동안에 연속적으로, 다른 실시예에서 전기삼투에 의해, 또는 또 다른 실시예에서 압력 구동형 유동에 의해, 저농도 버퍼의 소스를 제공할 수 있다.

[0186] 실시예 5

[0187] 채널의 특정한 배향은 공간 전하 영역의 안정도를 증가시킬 수 있음

[0188] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 물질의 예비농축은 나노유체형 채널(8-10)을 마이크로채널(8-20)의 양측에 위치시키고 마이크로채널과 유체로 연통시킴으로써 증강될 수 있다(도 8). 이온 고갈은 마이크로채널과 나노채널간의 계면에서 시작되기 때문에, 마이크로채널에 인접하여 하나의 나노채널만 존재할 경우, 이온 고갈은 분리가 일어날 수 있기 전에 마이크로유체형 채널의 전장에 걸쳐 연장되어야 한다. 도 8에 도시된 바와 같이, 나노채널을 마이크로채널의 어느 한 쪽에 위치시킴으로써 더 빠르고 더 완벽한 이온 고갈(8-30)을 달성할 수 있고, 실시예에 따라서는 더 안정한 공간 전하 영역을 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 단백질 농축 장치의 실시예를 개략적으로 나타내는 도면이다. (A)는 상기 장치의 레이아웃의 일 실시예이고, (B)는 (A)에서의 점선 표시 영역을 확대하여 나타내는 개략도이다. 마이크로채널(1-20)에 대한 나노채널(1-10)의 배향이 도시되어 있다. 각각의 전압이 인가되면, 도면에 표시되어 있는 바와 같이, 트래핑 영역(1-40) 및 고갈 영역(1-50)이 형성되고, 궁극적으로 샘플 저장조(1-30)로부터 유체의 전기삼투성 유동(EOF)이 촉진된다. E_T 는 이온 고갈 영역을 가로질러 인가되는 전장을 나타내는 한편, E_n 은 크로스 나노필터 전장(cross nanofilter electrical field)을 나타낸다.

[0035] 도 2는 단백질 농축 장치의 실시예를 개략적으로 나타내는 도면이다. 나노유체형 채널(2-10)은 2개의 마이크로유체형 채널(2-20)을 연결한다. 전장은 도시된 바와 같이 전극(2-30)에 의해 장치에 인가된다. 분자는 도시된 바와 같이 샘플 저장조(2-40)로부터 장치 내로 운반된다. 다른 용기들은 도시된 바와 같이 버퍼에 의해 마이크로채널(2-50)과 접촉 상태에 있다.

[0036] 도 3은 장치 내에서 하전된 종을 농축하는 메커니즘의 실시예를 개략적으로 나타내는 도면이다. (A) 나노필터를 가로질러 작은 전장이 인가될 때 농도 분극(concentration polarization) 효과가 관찰되지 않는다(E_n). (B) E_n 이 증가됨에 따라, 이온의 수송은 확산 제한형(diffusion-limited)이 되고, 이온 고갈 구역을 생성한다. 그러나, 상기 영역은 전기적 중성(electroneutrality)을 유지한다. (C) 강한 전장(E_n)이 인가되면, 나노채널은 유도된 공간 전하층을 발달시키게 되고, 여기서 전기적 중성은 더 이상 유지되지 않는다. (D) 애노드측에서 마이크로유체형 채널을 따라 추가적 전장(E_T)을 인가함으로써(V_s 로부터 V_D 로), 비선형 동전기적 유동(제2종의 전기삼투라 지칭됨)이 유도되고, 이것은 유도된 공간 전하층의 전방에서 생체분자의 신속한 축적을 초래한다.

[0037] 도 4는 채널 내 초점을 맞춘 단백질(GFP)의 형광 이미지이다. (A) 나노필터 부근에서 GFP 농축이 일어나고, 샘플 포집 50분 후에 초기 33pM GFP 용액의 로딩으로부터 이미지가 얻어졌다. 마이크로채널(폭 20 μ m, 깊이 1 μ m)은 흐린 선으로 나타나 있고, 나노필터는 고정 블록(깊이 40nm)으로 나타나 있다. (B) 노이즈 바닥(noise floor) 미만인 초기 농도(33pM GFP 용액)에서의 채널 형광 신호(fluorescence signal) 프로파일이다. (C) CCD 검출 기구에 의해 가까스로 검출가능한 농도 0.33 μ M GFP에서의 채널 형광 신호 프로파일이다. (D) 채널에서의 농축된 GFP의 형광 신호 프로파일이다(도 2(A)). 플러그(plug)의 농도는 (C)의 농도보다 훨씬 높다.

[0038] 도 5는 본 발명의 장치의 일 실시예의 안정성 및 효율을 나타낸다. (A) 33pM GFP 샘플을 예시된 장치의 상부 마이크로유체형 채널 내에 로딩한 직후 촬영한 형광 이미지이다. (B) $V_s=10V$, $V_D=5V$, 및 $V_{B1}=V_{B2}=0V$ 를 25분간 인가한 후 촬영한 이미지. (C) 저장조에서 동일한 전위 값으로 100분 후 촬영한 이미지. (D) 세 가지 상이한 농도를 구비한 묶은 GFP 용액으로부터 출발하여, 포집된 GFP 플러그의 국소 농도를 플롯한 것. (E) (D)에서의 33fM GFP 실험에 대한 근접도. 이것은 40분 이내에 적어도 10^7 배의 농도가 얻어졌음을 나타낸다.

[0039] 도 6은 포집된 생체분자의 방출을 나타낸다. (A) 농축 및 방출(모세관 전기영동) 단계 도중 저장조에 대해 인가된 전압을 나타내는 개략도이다. (B) 0초 내지 250초에서, 사용이 끝난 채널은 접지되었고, 전압은 트래핑

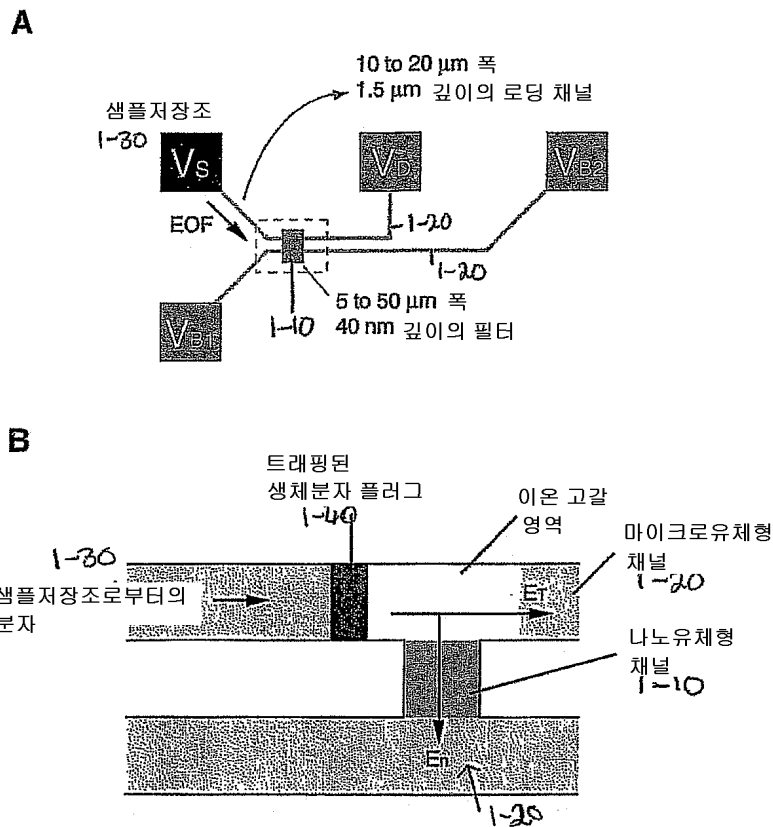
(trapping) 현상을 유발하는 필터를 가로질러 인가된다. 그 결과, 하류에 배치된 검출기는 CCD 어레이로부터 어두운 노이즈(dark noise)만을 판독한다. 0초 내지 30초를 나타내는 신호는 검출기와 나노필터 사이에서 유출되는 33pM GFP 용액으로부터 나온다(약 10mm). 각 단계를 보다 구체적으로 나타내기 위해, 중성 밀도 필터는 사용되지 않았다. 따라서, pM 레벨의 GFP 샘플은 검출가능한 범위에 있다. 250초 후, 사용이 끝난 채널은 부유시켜 상부 채널에서 포집 분자를 방출한다. (C) 형광 표지된 펩티드 샘플의 포집 및 방출을 나타낸다. 극도로 첨예한 샘플 플러그가 형성되고(500초 내에 1000배 이상의 예비농축 사용), 이것은 사용된 CCD 어레이를 포화시킨다. (D) 두 가지 상이한 단백질의 모세관 전기영동 분리로서, 5분 동안 공동 포집되고 방출(배출)된 것을 나타낸다.

[0040] 도 7은 버퍼 조건을 조작함으로써 공간 전하 영역을 더욱 안정화시킬 수 있는 본 발명의 일 실시예를 나타내는 도면이다.

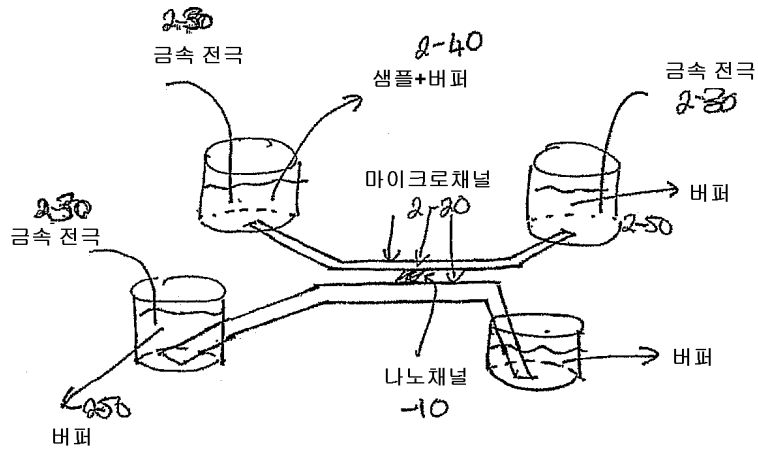
[0041] 도 8은 나노유체형 채널을 마이크로채널의 양측에 위치시키고 마이크로채널과 유체로 연통시킴으로써 물질의 예비농축을 증강시킬 수 있는 본 발명의 다른 실시예를 나타내는 도면이다.

도면

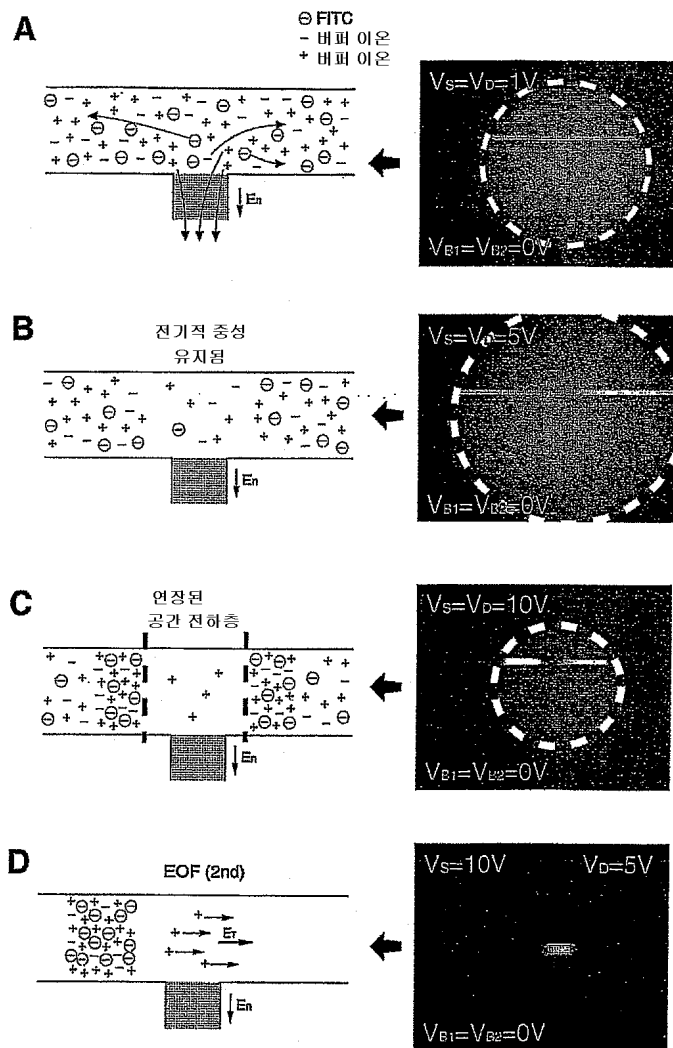
도면1



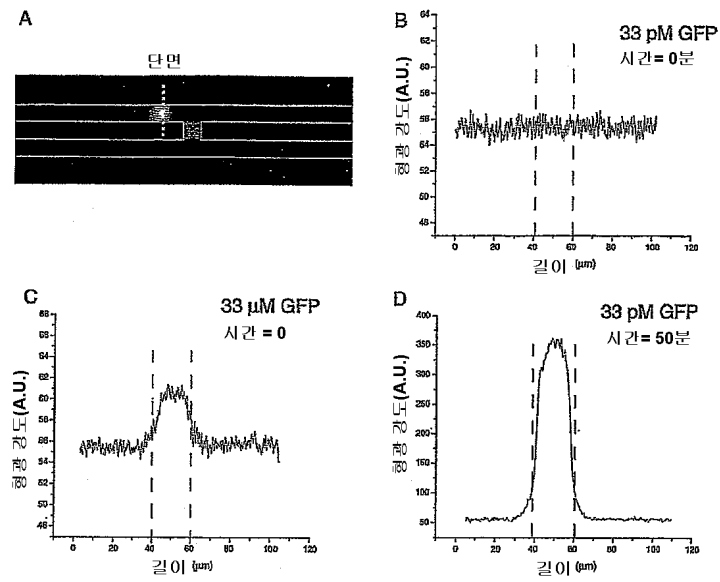
도면2



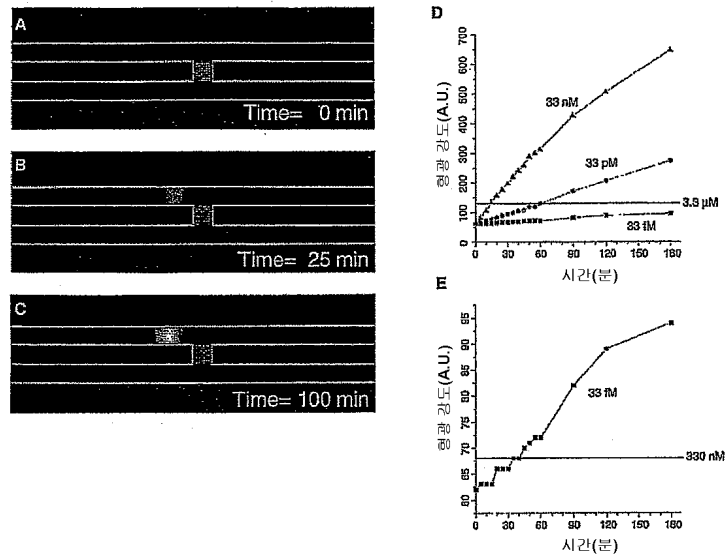
도면3



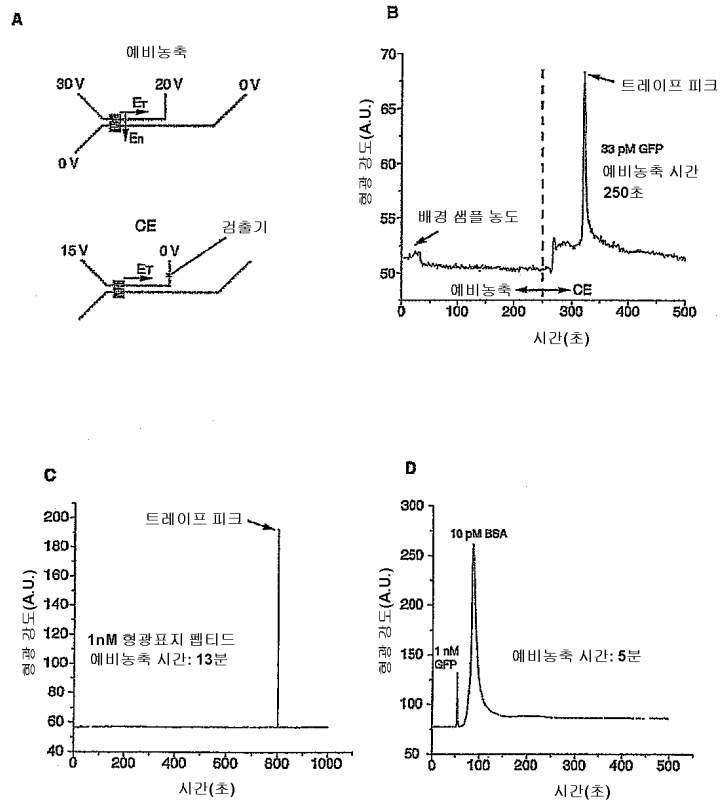
도면4



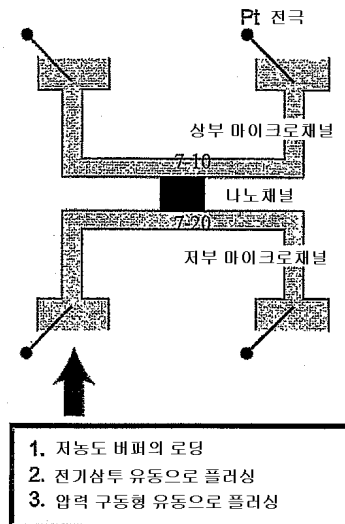
도면5



도면6



도면7



도면8

