



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0087415
(43) 공개일자 2011년08월03일

(51) Int. Cl.

C12M 1/36 (2006.01) C12N 15/87 (2006.01)
C12N 5/079 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2010-0006827

(22) 출원일자 2010년01월26일

심사청구일자 2010년01월26일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

신화성

인천광역시 남구 학익동 동아풍림아파트 108-103

(74) 대리인

김원식

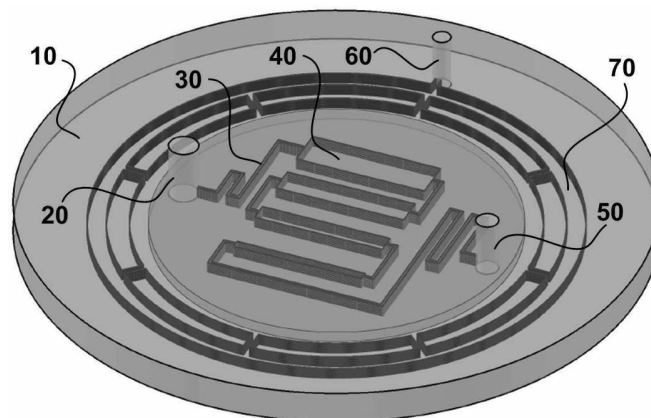
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치 및 이를 이용한 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력 산출방법

(57) 요약

본 발명은, 단면적이 상이한 다수의 챔버를 통해 통과되는 배지 플로우의 유속을 각 챔버별로 다르게 형성시킴으로써, 각각의 챔버에서 서로 다른 크기의 전단 응력을 발생시키고, 그에 따라 각 챔버에서의 형질전환 효율을 측정함으로써, 신경세포의 형질전환 효율을 높일 수 있는 최적의 전단 응력을 구할 수 있게 하는 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치 및 이를 이용한 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력 산출방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

신경세포가 배양되는 배양 디쉬에 부착되어, 배양 디쉬의 신경세포를 형질전환시키기 위한 미세유동 장치에 있어서,

배양 디쉬에 부착되는 플레이트 구조의 베이스;

베이스의 중심부에 고정 부착되고, 신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스가 함유된 배지 플로우가 주입되는 유동 채널;

배양 디쉬의 신경세포가 삽입될 수 있도록 저면이 개방되고, 상기 배지 플로우가 통과될 수 있도록 유동 채널에 연통되며, 배지 플로우에 의한 전단 응력이 서로 다르게 형성되도록 각각 상이한 단면적을 가지는 다수의 챔버;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

베이스의 저면에 고정 결합되고, 저면이 개방되어 배양 디쉬에 연통되며, 내부가 진공 상태를 이루면서 배양 디쉬의 표면에 고정 부착되는 고정 채널;

을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

유동 채널의 일측 끝단에 형성되고, 유동 채널에 주입되기 위한 배지가 저장되는 리저비어;

유동 채널의 타측 끝단에 형성되고, 리저비어에 저장된 배지가 유동 채널을 통해 각 챔버를 지나가도록 흡입하는 펌핑부;

를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치.

청구항 4

형질전환을 위한 신경세포가 배양되는 배양 디쉬를 준비하는 단계;

신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치를 준비하는 단계;

미세유동 장치를 배양 디쉬에 부착시키는 단계;

신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스가 함유된 배지 플로우를 일정하게 유동 채널에 주입하는 단계;

상기 배지 플로우가 순차적으로 각 챔버를 통과하면서, 각 챔버의 상이한 단면적에 따라 서로 다른 전단 응력을 형성하는 단계;

배지 플로우의 전단 응력에 의해 리포플렉스가 각 챔버의 신경세포를 형질전환시키는 단계;

각 챔버별로 신경세포의 형질전환 효율을 측정하여, 형질전환 효율이 가장 높은 챔버를 추출하는 단계;

하기의 수학식 1을 이용하여, 상기에서 추출된 형질전환 효율이 가장 높은 챔버에서의 전단 응력을 계산하는 단계;

[수학식 1]

$$\tau = \frac{6\mu Q}{wh^2}$$

(τ 는 전단 응력을 나타내고, μ 는 배지의 비스코시티(viscosity)를 나타내며, h 와 w 는 각각 챔버의 높이($100\mu m$)와 너비를 나타내고, Q 는 단위 부피당 배지의 유속을 나타낸다.)

를 포함하여 구성되고,

상기 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치는,

배양 디쉬에 부착되는 플레이트 구조의 베이스;

베이스의 중심부에 고정 부착되고, 신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스가 함유된 배지 플로우가 주입되는 유동 채널;

배양 디쉬의 신경세포가 삽입될 수 있도록 저면이 개방되고, 상기 배지 플로우가 통과될 수 있도록 유동 채널에 연통되며, 배지 플로우에 의한 전단 응력이 서로 다르게 형성되도록 각각 상이한 단면적을 가지는 다수의 챔버;

를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력 산출방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치 및 이를 이용한 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력 산출방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 단면적이 상이한 다수의 챔버를 통해 통과되는 배지 플로우의 유속을 각 챔버별로 다르게 형성시킴으로써, 각각의 챔버에서 서로 다른 크기의 전단 응력을 발생시키고, 그에 따라 각 챔버에서의 형질전환 효율을 측정함으로써, 신경세포의 형질전환 효율을 높일 수 있는 최적의 전단 응력을 구할 수 있게 하는 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치 및 이를 이용한 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력 산출방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 신경 발생학, 생리학, 기능학 등은 특정한 신경계 유전자에 관계되어 있어서, 유전자 표현형과 신경계의 조작성 유전자의 작용이나 조절을 이해하는데 매우 중요하다. 그로 인해, 많은 신경학 연구는 신경의 유전자 변형에 관심을 갖고 있으며, 유전자 물질을 신경세포에 효과적으로 형질전환시키기 위한 방법의 발달을 수반한다.
- [0003] 이러한 형질전환을 위한 유전자 전달 기술로써, 바이러스를 수송체로 사용하는 바이러스성 방법(viral vector-based transfer method)과, 합성 인지질이나 합성 양이온성 고분자 등을 사용하는 비바이러스성 방법(nonviral delivery technique)이 널리 알려져 있다.
- [0004] 바이러스는 그 자체의 생활 메커니즘상 다른 세포의 핵에 자신의 DNA를 넣은 상태로 기생하여 살기 때문에 아주 효율적인 DNA전달 체계로 볼 수 있다. 즉, 바이러스를 이용한 DNA전달 체계에서는 복제가 불가능한 바이러스 내부에 전달하고자 하는 유전자를 넣어서 이를 이용한다. 이러한 기술은 형질전환을 시키는데 상당히 효율적인 것이 장점이다. 그러나 이런 기술은 여러 가지 단점이 있는데, 본질적인 측면에서 보면 비활성화 바이러스를 사용하였다고는 하지만 recombination competent virus (RCV)의 출현이 가능하다는 위험성이 있으며, 면역 반응을 일으켜서 여러 번 사용이 힘들다는 등의 것이다.
- [0005] 비바이러스성 방법에는 calcium-phosphate, DEAE-dextran, Lipofectin 등의 cationic liposome 등이 DNA를 포장하는 시료로 사용된다. 비바이러스성 방법은 바이러스성 방법에 비해 안정성 측면에서 아주 우세한 강점이 있으며, 이입하고자 하는 유전자의 크기에 큰 제한이 없다. 그러나 비바이러스성 형질전환 방법은 외래의 유전자를 post-mitotic cell중 하나인 신경세포에 주입하는 것이 어렵기 때문에 신경계에 사용하기에는 낮은 효율을 가지고 있다. 게다가, 형질전환 시간, DNA와 매개물의 양과 같은 결정적인 몇몇 변수만이 최적화되어 있어 신경세포 유전자 조작에 빈약하게 이용되고 있는 실정이다.
- [0006] 한편, 이러한 비바이러스성 형질전환 방법 중에서도 리포솜을 이용한 형질전환 방법이 주로 연구되어 왔다. 일반적으로 비누나 세제에 사용되는 계면활성제들 같이 꼬리(tail)가 하나인 지질들은 보통 미셀을 형성하고 꼬리가 두 개인 지질은 2분자 막으로 구성된 폐쇄소포체를 형성하게 되는데, 이와 같이 구형의 폐쇄된 2분자 막의 구조를 갖는 것을 소포체(vesicle)라 하고, 이 소포체 중 주요 지질성분이 천연 또는 합성의 인지질로 구성된 폐쇄소포체를 리포솜(liposome)이라고 한다. 이러한 리포솜은 동식물의 세포막과 매우 유사한 성분과 구조로 되어 있어서 세포막 기능 연구에 사용되기도 하며, 생체막과의 친화력을 이용하여 형질전환 등에 사용되고

있다.

- [0007] DNA는 그 자체만으로는 체내에 투여해도 표적세포 내로 들어가지 못한다. 리포솜은 이러한 DNA를 내부에 함유(encapsulation) 시키거나 정전기적으로 결합(binding)한 형태로 세포막을 통과하여 세포 내로 전달할 수 있다.
- [0008] 세포의 표면에는 다양한 glycolipid와 glycoprotein의 말단부위가 돌출되어 있고, 그 구성 성분 중 sialic acid에 의해 세포 표면이 음전하를 갖게 한다. 전체적으로 양전하를 띠는 리포솜/DNA 복합체(이하 '리포플렉스')는 음으로 하전된 세포 표면에 정전기적으로 쉽게 접근할 수 있게 된다.
- [0009] 이러한 리포플렉스(Lipoplex)의 세포내 전달과정은 다음과 같이 크게 4단계로 요약될 수 있다.
- [0010] ① 리포플렉스 형성
- [0011] 리포솜을 DNA와 서서히 결합하면서 DNA를 수축시켜 리포솜과의 결합체인 리포플렉스(Lipoplex)를 형성한다.
- [0012] ② 세포 내 유입(endocytosis)
- [0013] 리포플렉스를 투여하여 리포솜이 세포막과 결합(융합)하면서, 세포 내로 유입되어 엔도솜(endosome)을 형성한다. 이후 엔도솜을 깨고 세포질 내로 나와서 DNA를 유리시킨다.
- [0014] ③ 핵 내 이동
- [0015] DNA가 핵 내로 이동하며, 이때 핵 내 경로 서열(nuclear localization signal)이 필요할 수도 있다. DNA는 핵 공(nuclear pore)을 통해 핵 내부로 들어간다.
- [0016] ④ 유전자 발현
- [0017] 전달된 유전자가 전사 및 번역되어 단백질을 생산하는 과정으로 전달된 유전자의 특성에 따라 작용명령을 전달하고 작동되기 시작한다.
- [0018] 위에서 기술한 4단계 중 세포내 유입 단계에서 리포플렉스와 목적세포의 접촉 빈도, 그리고 접촉 면적의 증가는 형질전환의 효율 증가를 이끈다.
- [0019] 한편, Harris와 Giorgio는 대류(convective flow)에 의해 단층세포에 대한 리포플렉스의 전달이 증가된다는 것을 증명했다. 즉, 대류에 의해 발생한 전단 응력(shear stress)이 리포플렉스와 세포 표면의 접촉 비율을 증가시키게 되어, 초기 신경세포에 대한 형질전환 효율이 향상될 수 있게 된다.
- [0020] 그러나 세포는 다양한 물리적, 화학적 환경에 따라 다르게 행동한다. 따라서 대류의 흐름 속도는 형질전환이 의존하는 세포 주기에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.
- [0021] 그러므로 특정 신경세포에 대해 전단 응력이 형질전환 효율에 미치는 영향을 정확하게 확인하고, 또한 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력(shear stress)을 발생시킬 수 있는 장치의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 본 발명은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 리포플렉스를 이용한 신경세포의 형질전환 효율을 높일 수 있는 최적의 전단 응력을 용이하게 구할 수 있게 하는 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치 및 이를 이용한 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력 산출방법을 제공하는 것을 본 발명의 주요한 목적으로 한다.
- [0023] 또한 본 발명은, 신경세포의 형질전환을 위한 주요 변수로서의 전단 응력과 형질전환 효율의 상관 관계를 용이하게 측정할 수 있게 하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0024] 상기와 같은 목적을 해결하기 위한 본 발명에 따른 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치는, 신경세포가 배양되는 배양 디쉬에 부착되어, 배양 디쉬의 신경세포를 형질전환시키기 위한 미세유동 장치에 있어서, 배양 디쉬에 부착되는 플레이트 구조의 베이스; 베이스의 중심부에 고정 부착되고, 신경세포의 형질전환을 위한 리포

플렉스가 함유된 배지 플로어가 주입되는 유동 채널; 배양 디쉬의 신경세포가 삽입될 수 있도록 저면이 개방되고, 상기 배지 플로어가 통과될 수 있도록 유동 채널에 연통되며, 배지 플로어에 의한 전단 응력이 서로 다르게 형성되도록 각각 상이한 단면적을 가지는 다수의 챔버;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0025] 또한 상기 미세유동 장치는, 베이스의 저면에 고정 결합되고, 저면이 개방되어 배양 디쉬에 연통되며, 내부가 진공 상태를 이루면서 배양 디쉬의 표면에 고정 부착되는 고정 채널;을 더 포함하여 구성되는 것이 바람직하다.

[0026] 아울러, 상기 미세유동 장치는, 유동 채널의 일측 끝단에 형성되고, 유동 채널에 주입되기 위한 배지가 저장되는 리저비어; 유동 채널의 타측 끝단에 형성되고, 리저비어에 저장된 배지가 유동 채널을 통해 각 챔버를 지나가도록 흡입하는 펌프부;를 더 포함하여 구성될 수도 있다.

[0027] 그리고 본 발명에 따른 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력 산출방법은, 형질전환을 위한 신경세포가 배양되는 배양 디쉬를 준비하는 단계; 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치를 준비하는 단계; 미세유동 장치를 배양 디쉬에 부착시키는 단계; 신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스가 함유된 배지 플로어를 일정하게 유동 채널에 주입하는 단계; 상기 배지 플로어가 순차적으로 각 챔버를 통과하면서, 각 챔버의 상이한 단면적에 따라 서로 다른 전단 응력을 형성하는 단계; 배지 플로어의 전단 응력에 의해 리포플렉스가 각 챔버의 신경세포를 형질전환시키는 단계; 각 챔버별로 신경세포의 형질전환 효율을 측정하여, 형질전환 효율이 가장 높은 챔버를 추출하는 단계; 하기의 수학적식을 이용하여, 상기에서 추출된 형질전환 효율이 가장 높은 챔버에서의 전단 응력을 계산하는 단계;를 포함하여 구성되고,

$$\tau = \frac{6\mu Q}{wh^2}$$

[0028]

[0029] (τ 는 전단 응력을 나타내고, μ 는 배지의 비스코시티(viscosity)를 나타내며, h 와 w 는 각각 챔버의 높이(100 μ m)와 너비를 나타내고, Q 는 단위 부피당 배지의 유속을 나타낸다.)

[0030] 여기서 상기 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치는, 배양 디쉬에 부착되는 플레이트 구조의 베이스; 베이스의 중심부에 고정 부착되고, 신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스가 함유된 배지 플로어가 주입되는 유동 채널; 배양 디쉬의 신경세포가 삽입될 수 있도록 저면이 개방되고, 상기 배지 플로어가 통과될 수 있도록 유동 채널에 연통되며, 배지 플로어에 의한 전단 응력이 서로 다르게 형성되도록 각각 상이한 단면적을 가지는 다수의 챔버;를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0031] 상기와 같은 구성을 가지는 본 발명에 따른 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치 및 이를 이용한 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력 산출방법에 의하면, 신경세포의 형질전환을 위한 주요 변수로서의 전단 응력과 형질전환 효율의 상관 관계를 용이하게 측정할 수 있게 된다.

[0032] 또한 본 발명에 의하면, 신경세포의 형질전환 효율을 높일 수 있는 최적의 전단 응력을 용이하게 구할 수 있다.

[0033] 또한 본 발명에 의하면, 리포플렉스를 이용하여 신경세포를 형질전환시킴에 있어서, 다른 변수를 모두 고정된 상태에서 배지 플로어의 유속과 챔버의 너비를 조절함으로써 유일한 변수인 전단 응력을 용이하게 조절할 수 있게 된다.

[0034] 또한 본 발명에 의하면, 분열되거나 분열되기 전의 신경세포 모두에 대해 형질전환 효율을 높이기 위한 최적의 전단 응력을 구할 수 있게 된다.

[0035] 또한 본 발명에 의하면, 체내에서 다양한 부피를 갖는 혈관을 통한 세포치료와 같은 생체모방의 전단 응력 유발 현상에도 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1 내지 도 3은 본 발명에 따른 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치를 나타내는 사시도, 측면도 및 평면도.

도 4는 전단 응력에 따른 초기 신경세포와 NIE-115 세포 형질전환 효율을 나타내는 사진.

도 5 및 도 6은 전단 응력에 따른 초기 신경세포와 NIE-115 세포 형질전환 효율을 나타내는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하에서는 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치에 대한 바람직한 실시예를 상세하게 설명한다.
- [0038] 도 1 내지 도 3에는 본 발명에 따른 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치를 나타내는 사시도, 측면도 및 평면도가 도시되어 있다.
- [0039] 도 1 내지 도 3을 참조하면, 본 발명에 따른 미세유동 장치는 신경세포가 배양되는 배양 디쉬(Culture Dish)에 부착되어 신경세포를 형질전환(transfection)시키기 위한 것으로서, 배양 디쉬에 부착되는 플레이트 구조의 베이스(10), 베이스(10)의 중심부에 고정 부착되어 신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스(lipoplex)가 함유된 배지 플로우(medium flow)가 통과하는 유동 채널(30), 상기 유동 채널(30)에 연통되고 단면적이 서로 다르게 형성되는 다수의 챔버(40)를 포함하여 구성된다.
- [0040] 여기서, 상기 배양 디쉬에 부착되는 베이스(10)는 유동 채널(30) 및 각 챔버(40)를 지지하기 위한 몸체를 구성하는 것으로서, PDMS(Polydimethylsiloxane) 재질의 플레이트 구조로 이루어지는 것이 바람직하다. 즉, 상기 베이스(10)는 PDMS를 이용하여 신속 조형(rapid prototyping) 및 소프트 리소그래피(soft lithography) 방식으로 만들어진다. 그리고 베이스(10)의 마스터(master) 틀을 만들기 위해 SU-8 네거티브 포토레지스트(negative photoresist)가 사용된다.
- [0041] 이러한 베이스(10)는 신경세포가 배양되고 있는 배양 디쉬의 표면에 직접 접촉하지 않은 상태에서, 배양 디쉬에 가역적으로 고정 부착되도록 구성되는 것이 바람직하다.
- [0042] 이를 위해, 본 발명에 따른 미세유동 장치는, 베이스(10)의 저면에 고정 결합되고, 저면이 개방되어 배양 디쉬에 연통되며, 내부가 진공 상태를 이루면서 배양 디쉬의 표면에 고정 부착되는 고정 채널(70)을 더 포함하여 구성되는 것이 바람직하다.
- [0043] 또한 본 발명에 따른 미세유동 장치는, 상기 고정 채널(70) 내부를 진공 상태로 만들어서 베이스(10)를 배양 디쉬에 고정시킬 수 있도록 고정 채널(70) 내부의 공기를 외부로 흡입하기 위한 진공 튜브(60)를 더 포함하여 구성될 수 있다.
- [0044] 상기 베이스(10)의 저면에는 환형의 고정 채널(70) 상면이 고정 결합되는데, 이때 고정 채널(70)의 저면은 개방되어 배양 디쉬의 표면에 연통되는 구조로 이루어진다. 따라서 진공 튜브(60)를 통해 공기를 흡입하면, 고정 채널(70) 내부가 진공 상태를 이루면서 배양 디쉬의 표면에 고정 부착되고, 결국 미세유동 장치는 배양 디쉬의 표면에 가역적으로 고정 결합된다. 또한 상기 진공 튜브(60)를 통해 공기를 주입하게 되면, 고정 채널(70)은 배양 디쉬의 표면에 단순 접촉 상태가 되고, 결국 미세유동 장치를 배양 디쉬의 표면에서 분리시킬 수 있게 된다.
- [0045] 한편, 이러한 고정 채널(70)을 디자인함에 있어서 별다른 제한은 없고, 그 폭의 범위는 50 ~ 500 μm 정도가 바람직하다.
- [0046] 그리고 미세유동 장치를 배양 디쉬에 고정시키기 위한 고정 채널(70)과, 미세유동 장치의 각 챔버(40)를 연결하는 유동 채널(30) 사이의 누설을 막기 위해, 고정 채널(70)과 유동 채널(30)은 대략 0.2 ~ 2mm 정도 떨어져 있게 구성되는 것이 바람직하다.
- [0047] 따라서 각 챔버들(40)과 진공의 고정 채널(70)들이 상호 떨어져 있기 때문에, 고정 채널(70)들을 진공 상태로 만들어서 미세유동 장치를 배양 디쉬에 결합할 때, 신경세포가 배양 디쉬에 미리 존재하고 있어도 미세유동 장치의 결합으로 인해 세포에 손상이 발생하지 않게 된다.
- [0048] 그리고 상기 베이스(10)의 중심부에는 외부의 배지 플로우를 이동시키기 위한 유동 채널(30)이 고정 부착되고, 상기 유동 채널(30)에 주입되는 배지 플로우에는 신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스가 함유되어 있다.
- [0049] 또한 본 발명에 따른 미세유동 장치는, 상기 배지 플로우를 유동 채널(30)에 주입시키기 위해, 유동 채널(30)의 일측 끝단에 형성되어 유동 채널(30)에 주입되기 위한 배지가 저장되는 리저비어(reservoir)(20)와, 유동 채널(30)의 타측 끝단에 형성되어 리저비어(20)에 저장된 배지를 흡입하는 펌핑부(50)를 더 포함하여 구성되는 것이 바람직하다.
- [0050] 이처럼, 유동 채널(30)의 일측 끝단에는 유동 채널(30)에 주입되기 위한 배지(신경세포의 형질전환을 위한 리포

플렉스 함유)가 저장되는 리저비어(20)가 형성된다. 그리고 유동 채널(30)의 타측 끝단에는 리저비어(20)에 저장된 배지를 흡입하여 유동 채널(30)을 통해 각 챔버(40)로 순환시키기 위한 펌프부(50)가 형성된다.

[0051] 따라서 펌프부(50)를 통해 리저비어(20)에 저장된 배지를 흡입하면, 리저비어(20)에 저장된 배지와, 그 배지에 수용된 리포플렉스가 유동 채널(30)을 따라 이동하면서 각 챔버(40)를 순차적으로 지나가게 되고, 각 챔버(40)를 지나가는 동안 배지에 수용된 리포플렉스가 신경세포의 표면에 접촉된 후, 배지 플로우에 의해 발생하는 전단 응력에 의해 리포플렉스가 신경세포를 형질전환시키게 된다.

[0052] 그리고 이러한 유동 채널(30)의 중간 중간에는 단면적이 서로 다른 다수의 챔버(40)가 일정 간격으로 떨어져서 순차적으로 위치하고, 각 챔버(40)는 유동 채널(30)에 연통된다. 따라서 리저비어(20)에서 유동 채널(30)에 주입된 일련의 배지 플로우가 유동 채널(30)을 통해 이동하면서 순차적으로 각 챔버(40)를 통과하게 된다.

[0053] 여기서, 상기 각 챔버(40)는 배양 디쉬의 신경세포가 삽입될 수 있도록 저면이 개방되는 구조로 이루어지고, 저면을 제외한 각 챔버(40)의 나머지 부분, 즉 상면 및 양 측면은 폐쇄된 구조로 이루어지는 것이 바람직하다.

[0054] 따라서 베이스(10)를 배양 디쉬에 부착시키면 베이스(10)의 중심부에 형성된 각 챔버(40)들은 배양 디쉬의 표면에 접촉하게 되고, 이때 각 챔버(40)의 저면이 개방된 구조로 이루어지므로, 배양 디쉬에서 배양되고 있던 신경세포들이 각 챔버(40)에 삽입되어, 그 삽입된 챔버(40) 안에서 배양되는 상태가 된다.

[0055] 또한 상기 각 챔버(40)의 단면적이 서로 다른 크기로 이루어지고, 그로 인해 각 챔버(40)를 지나가는 배지 플로우의 유속(flow rate) 역시 챔버(40)별로 상이하게 나타나게 된다.

[0056] 그리고 신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스를 함유한 배지 플로우가 순차적으로 각 챔버(40)를 통과하는 과정에서, 배지에 함유된 리포플렉스가 각 챔버(40)에서 배양되고 있는 신경세포에 접촉된다. 이때, 각 챔버(40)를 지나가는 배지 플로우는 리포플렉스에 대해 전단 응력을 발생시킴으로써, 리포플렉스가 신경세포에 보다 쉽게 삽입될 수 있게 하여 신경세포의 형질전환을 돕게 된다.

[0057] 한편, 상기 배지 플로우는 서로 다른 단면적을 가지는 챔버(40)의 구조로 인해 각 챔버(40)별로 상이한 유속을 형성하게 되고, 이처럼 상이한 배지 플로우의 유속으로 인해 각 챔버(40)별로 상이한 전단 응력이 발생하게 된다.

[0058] 이처럼 각 챔버(40)에서 발생하는 전단 응력은 해당 챔버(40)를 지나가는 순간의 배지의 유속에 의해 결정된다. 그리고 유동 채널(30)에 주입되는 배지 플로우의 유속을 일정하게 하면, 결국 챔버(40)를 통과할 때 배지 플로우의 유속은 각 챔버(40)의 단면적에 의해 결정되고, 각 챔버(40)에서 발생하는 전단 응력은 하기의 수학적식을 통해 계산될 수 있다.

수학적식 1

$$\tau = \frac{6\mu Q}{w h^2}$$

[0059]

[0060] 여기서, τ 는 전단 응력을 나타내고, μ 는 배지의 비스코시티(viscosity)를 나타내며, h 와 w 는 각각 챔버의 높이($100\mu m$)와 너비를 나타내고, Q 는 단위 부피당 배지의 유속을 나타낸다. 이때, 상기 단위 부피당 배지의 유속(Q)은 리저비어(20)에서 유동 채널(30)에 공급될 때의 배지 플로우 유속을 나타내므로, 이러한 단위 부피당 배지의 유속(Q)는 일정하게 유지될 수 있다.

[0061] 따라서 상기 수학적식 1에서 배지의 비스코시티(μ)와 단위 부피당 배지의 유속(Q)은 일정하게 유지되므로 상수가 되고, 챔버(40)의 높이(h)와 너비(w)만 변수로 남게 되므로, 결국 각 챔버(40)를 통과하는 배지 플로우에 의해 형성되는 전단 응력은 챔버(40)의 단면적에 의해 결정된다고 할 것이다.

[0062] 또한 도 1 및 도 3에 도시된 바와 같이 모든 챔버(40)의 높이(h)를 동일하게 설정하고 너비(w)만 서로 다르게 설정하면, 각 챔버(40)를 통과하는 배지 플로우에 의해 형성되는 전단 응력은 챔버(40)의 너비(w)에 의해 결정된다고 할 것이다. 반대로, 챔버(40)의 너비(w)를 동일하게 하여 상수로 설정하면, 전단 응력은 각 챔버(40)의 높이(h)에 의해 결정될 수 있을 것이다.

[0063] 이러한 방식으로 각 챔버(40)를 지나가는 배지 플로우에 의해 발생하는 전단 응력을 구하고, 또한 각 챔버(40)

에서 배양되는 신경세포에 대한 형질전환 효율을 측정하여, 신경세포의 형질전환 효율을 높일 수 있는 최적의 전단 응력을 구할 수 있게 된다. 또한 최적의 전단 응력을 발생시킬 수 있는 변수로서, 챔버(40)의 단면적, 챔버(40)의 높이와 너비 중 어느 하나를 구할 수도 있게 된다.

- [0064] 한편, 상기에서 설명한 미세유동 장치를 이용하여 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력을 산출하는 과정에 대해 살펴본다.
- [0065] 우선, 형질전환을 위한 신경세포가 배양되는 배양 디쉬를 준비하고, 또한 신경세포의 형질전환을 위한 미세유동 장치를 준비한다. 이러한 미세유동 장치의 구성은 전술한 바와 같다.
- [0066] 그리고 미세유동 장치를 배양 디쉬에 부착시키게 되는데, 전술한 바와 같이 고정 채널(70) 내부를 진공 상태를 만드는 방식으로 미세유동 장치를 배양 디쉬에 가역적으로 고정 부착시킬 수 있다.
- [0067] 이후, 신경세포의 형질전환을 위한 리포플렉스가 함유된 배지 플로우를 일정하게 유동 채널(30)에 주입하면, 상기 배지 플로우가 순차적으로 각 챔버(40)를 통과하면서, 각 챔버(40)의 상이한 단면적에 따라 서로 다른 전단 응력을 형성하게 된다.
- [0068] 그리고 배지 플로우의 전단 응력에 의해 리포플렉스가 각 챔버(40)의 신경세포를 형질전환시키게 되는데, 각 챔버(40)별로 전단 응력이 상이하게 나타나므로 각 챔버(40)별로 형질전환 효율(transfection efficiency)도 상이하게 나타나게 된다.
- [0069] 따라서 각 챔버(40)별로 신경세포의 형질전환 효율을 측정하여, 형질전환 효율이 가장 높은 챔버(40)를 추출하고, 상기 수학식 1을 이용하여 형질전환 효율이 가장 높은 챔버(40)에서의 전단 응력을 계산함으로써, 신경세포를 형질전환시키기 위한 최적의 전단 응력을 구할 수 있게 된다.
- [0070] 이하에서는 상기와 같이 구성되는 본 발명에 따른 미세유동 장치를 이용하여 신경세포의 형질전환을 위한 최적의 전단 응력을 구하는 과정의 실험예를 살펴본다.

1. 세포 배양

- [0071] 초기 신경세포는 E18 rat의 피질 조직에서 얻어서 종래의 일반적인 방법으로 배양한다. 예를 들어, CMF-HBSS 용액(갈슘과 마그네슘이 결여되고 4.2 mM sodium bicarbonate, 1 mM pyruvate, 0.3% bovine serum albumin이 보충된 헵크스액)에서 diE18 rat эмбри오(embryo)를 절개해서 얻은 피질의 조직을 CMF로 행구고, 37℃에서 7분 동안 0.5 mM EDTA와 0.125% 트립신을 함유하는 CMF-HBSS 용액에서 트립신 처리한다.
- [0073] 10% fetal calf serum이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)으로 트립신 처리를 중지시킨다. 1 분동안 1000 rpm에서 원심분리하여 조직 펠렛을 얻고, 배양 배지(B27, GlutaMAX, penicillin - streptomycin이 보충된 Neurobasal medium)에서 재차 현탁한 후, 파스퇴르 피펫으로 분쇄하고, 4×10^6 cells/ml 밀도로 만든다.
- [0074] 그리고 N1E-115 세포는 이미 공지된 프로토콜에 따라 배양된다. 예를 들어, N1E-115 세포들은 배양 배지(0.13% NaHCO₃를 함유하고, 2% L-glutamine, 120 U/ml penicillin, 12 U/ml streptomycin, 13% fetal bovine serum이 첨가된 DMEM)에서 성장된다.

2. 실험 절차

- [0076] 초기 신경세포는 4×10^6 cells/ml 밀도의 신경세포 배양 배지에서 6-well plate로 코팅된 poly-L-lysine에 접종된다. 이때, 미세유동 장치를 신경세포 배양 디쉬에 부착시키기 전에 각 챔버 안에 거품이 들어가지 않도록 한다. 한편, 산소 플라즈마 처리는 유동 채널(30)의 표면을 친수성으로 만들어주는데 도움이 될 수 있다.
- [0077] 미세유동 장치를 배양 디쉬에 부드럽게 안착시킨 후, 0.38mm 폴리에틸렌 튜브를 10ml 주사기에 연결하여 진공 튜브를 통해 공기를 흡입함으로써 고정 채널(70) 내부를 진공 상태로 만들면, 미세유동 장치는 배양 디쉬에 가역적으로 고정 결합된 상태가 된다.
- [0078] 그리고 미세유동 장치가 고정 부착된 배양 디쉬의 복합체를 37℃, 5% 이산화탄소의 배양기에 넣는다.
- [0079] 한편, pcDNA/GFP 벡터를 이용하면 녹색 형광 단백질 발현을 통해 형질전환 효율을 쉽게 측정 할 수 있다.

- [0080] 그리고 리포플렉스(Lipoplex)를 다음과 같이 준비한다.
- [0081] 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 $1\mu\text{g}$ 과 플라스미드(plasmid) $1\mu\text{g}$ 을 각각 Opti-MEM I Reduced Serum Medium으로 분리해서 희석하고, 상온에서 혼합한다.
- [0082] 그 결과물인 리포플렉스를 리저비어(20)에 넣어주고, 0.38mm 폴리에틸렌 튜브로 연결된 시린지 펌프로 2시간 동안 흡입하여 유동 채널(30) 내에 배지의 흐름을 준다.
- [0083] 진공을 끄고, 배양 디쉬에 있는 형질전환 된 세포를 미세유동 장치에서 분리하고, 탐지 전 1일동안 개방된 배양 배지에서 배양한다.
- [0084] 3군데의 다른 곳의 형광사진을 Nikon E800 upright microscope로 얻고, 형질전환 효율을 전체 세포에 대한 GFP 발현 세포의 수로 구한다.
- [0085] 그리고 각 챔버(40)의 전단 응력은 전술한 수학적 식 1을 이용하여 계산한다.
- [0086] 3. 실험 결과
- [0087] 배양 디쉬에 있는 세포는 배지 흐름에 의한 전단 응력이나 세포에 대한 리포플렉스 캐스팅에 의해 형질전환 중 세포에 손상을 가속화시켜 떨어지거나 죽기 쉽다. 그러므로 전단 응력이 형질전환 효율에 미치는 영향을 조사하기 전에, 세포에 손상을 주지 않는 가장 높은 효율을 보이는 한계의 전단 응력을 조사할 필요가 있다.
- [0088] 0.1 ~ 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 다양한 부피당 흐름 속도를 조사하였다.
- [0089] 너비가 가장 좁은 챔버(100 μm)는 부피당 흐름속도가 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 에서 형질전환 몇 시간 후 씻겨 내려가거나 죽는데, 이때의 전단 응력은 0.38 dyne/cm²이다. 너비가 100 μm 인 챔버에서 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 흐름(0.30 dyne/cm²)은 세포가 씻겨 내려가지 않을 것 같지만, 세포가 형질전환과 GFP 발현 후 죽기 시작했다.
- [0090] 이것은 세포 표면에 흐름 외에 리포플렉스의 무리한 충돌이 손상을 준다는것을 나타낸다. 전단 응력과 리포플렉스는 세포가 노출되는 동안 유해하게 작용할 수 있다. 미세유동 장치 안에서의 세포 손상은 상기 두가지 원인의 복합적인 영향을 이해할 수 있게 해준다.
- [0091] 이 사전 실험을 기본으로, 모든 실험에서 형질도입에 대한 흐름속도의 영향을 반영하기 위해 부피당 흐름을 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 에서 실행하였고, 이것은 가장 작은 챔버(100 μm 너비)에서 형질전환 이후 세포의 죽음을 막는 가장 높은 흐름 속도이다.
- [0092] 결국, 본 발명에 따른 미세유동 장치를 이용하면 전단 응력을 제외한 형질전환 효율에 영향을 주는 모든 변수를 한 번에 고정할 수 있으므로, 전단 응력과 형질전환 효율의 상관 관계를 정확하게 측정할 수 있게 된다.
- [0093] 도 4의 (A) ~ (C)와 도 5는 서로 다른 전단 응력에 따른 초기 신경세포(primary neuron)의 형질전환 효율(transfection efficiency)의 특징을 나타낸다. 그리고 도 4의 (D) ~ (F)와 도 6은 서로 다른 전단 응력에 따른 N1E-115 세포의 형질전환 효율(transfection efficiency)의 특징을 나타낸다.
- [0094] 상기 도 4에서, (A)는 초기 신경세포에 대해 전단 응력이 없는 경우의 GFP 발현을 나타내고, (B)는 초기 신경세포에 대해 2.2×10^{-2} dyne/cm³의 전단 응력이 가해진 경우의 GFP 발현을 나타내며, (C)는 초기 신경세포에 대해 9.1×10^{-2} dyne/cm³의 전단 응력이 가해진 경우의 GFP 발현을 나타낸다. 그리고 (D)는 N1E-115 세포에 대해 전단 응력이 없는 경우의 GFP 발현을 나타내고, (E)는 N1E-115 세포에 대해 2.2×10^{-2} dyne/cm³의 전단 응력이 가해진 경우의 GFP 발현을 나타내며, (F)는 N1E-115 세포에 대해 9.1×10^{-2} dyne/cm³의 전단 응력이 가해진 경우의 GFP 발현을 나타낸다.
- [0095] 그리고 도 5와 도 6은 각각 초기 신경세포와 N1E-115 세포에 대한 GFP 발현 효율을 나타내는 그래프이다.
- [0096] 낮은 흐름속도에서 초기 신경세포와 N1E-115의 p-values는 각각 [0.030, 0.009, 0.010, 0.050]와 [0.007, 0.030, 0.060, 0.070]과 같다. 낮은 p-values는 실험결과를 증명하는데 도움을 준다.
- [0097] 도 4(A-C) 및 도 5를 참조하면, 전단 응력이 증가할수록 형질전환 효율은 흐름이 없을 때와 비교해서 3배 증가하였다. 그러나 0.228에서의 효율은 증가하지 않고 조금 감소하였다. 또한 너무 높은 전단 응력에서는 중요한

형질도입 효율의 증가가 발견되지 않았다.

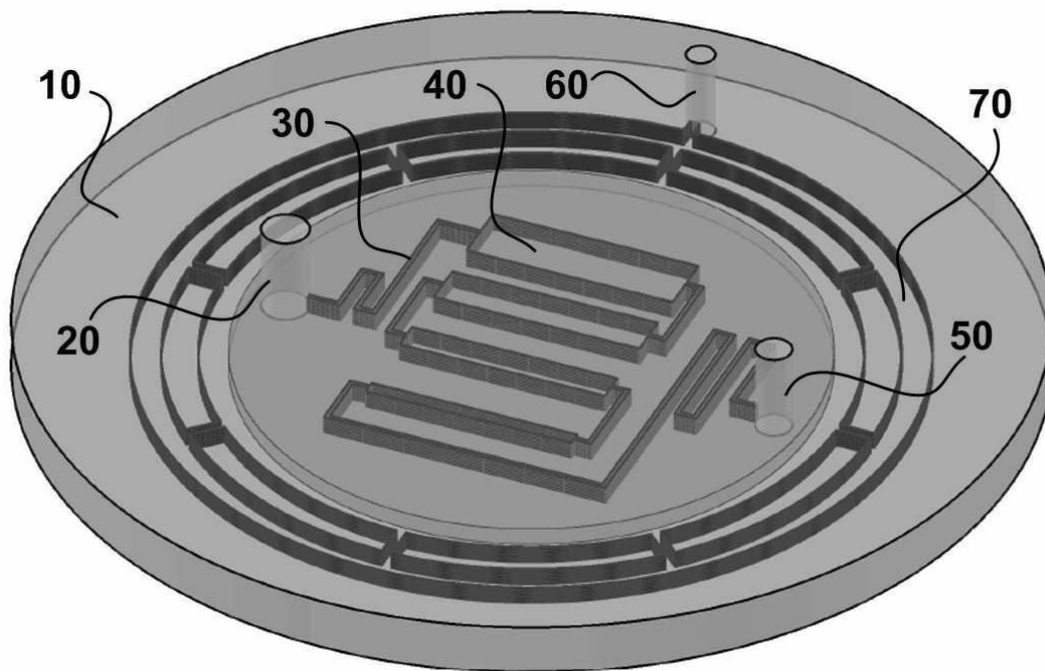
- [0098] 이러한 물리적 현상을 고려할 때, 유전적 표현은 삽입된 플라스미드의 수, 그리고 리포플렉스와 세포 표면 사이의 충돌과 접촉 횟수에 비례해야 한다. 흐름속도의 증가는 충돌 횟수를 증가시키지만, 동시에 리포플렉스가 세포 표면에 녹기 전에 세포 표면으로부터 씻겨내려 가므로 접촉에는 부정적이다.
- [0099] 따라서 전단 응력의 증가는 형질전환 효율을 증가시킬 수 있지만, 너무 높은 전단 응력은 오히려 형질전환 효율을 감소시키게 되므로, 이를 통해 형질전환 효율을 극대화시킬 수 있는 최적의 전단 응력을 구할 수 있을 것이다.
- [0100] 한편, 세포벽 안으로 DNA 이동은 전사가 일어나는 핵 안으로 들어가야 한다. 이때, 초기 신경세포와 같이 분할되지 않은 세포는 작은 핵공을 통해 높은 외부의 DNA가 들어가므로 높은 효율의 형질전환을 얻기 어렵다. 반대로, 분할된 세포는 상대적으로 외부의 DNA가 형질전환되기 쉽다.
- [0101] 도 4(D-F)와 도 6을 참조하면, 전단 응력의 증가로 인해 NIE-115 세포의 형질전환 효율이 44% 증가된 결과가 나타내는데, 이것은 전단 응력이 없을 때보다 2배 증가한 것이다.
- [0102] 그러나 너무 높은 전단 응력은 오히려 NIE-115 세포의 형질전환 효율을 감소시키는데, 이러한 결과는 초기 신경세포에서도 비슷하게 나타난다.
- [0103] 이러한 결과로부터 전단 응력은 분열되거나 분열되기 전의 신경세포에 DNA분자의 삽입을 증가시켜서 형질전환 효율을 증가시킨다는 결론을 도출할 수 있고, 결국 본 발명에 따른 미세유동 장치는 분열되거나 분열되기 전의 신경세포에 리포플렉스를 형질전환시키기 위한 최적의 전단 응력을 구할 수 있는 장치라고 할 것이다.
- [0104] 결론적으로, 전단 응력의 증가는 형질전환 효율을 증가시킬 수 있지만, 너무 높은 전단 응력은 오히려 형질전환 효율을 감소시키게 되므로, 본 발명에 따른 미세유동 장치에 구비된 다양한 너비를 가지는 다수의 챔버를 이용하여 다양한 크기의 전단 응력을 발생시킴으로써, 형질전환 효율을 극대화시킬 수 있는 최적의 전단 응력을 구할 수 있게 된다.
- [0105] 이상의 설명에서 본 발명은 신경세포의 형질전환에 관련하여 도시 및 설명하였지만, 특허청구범위에 의해 나타난 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 한도 내에서 다른 세포들의 형질전환에도 적용할 수 있다는 것을 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구나 쉽게 알 수 있을 것이다.

부호의 설명

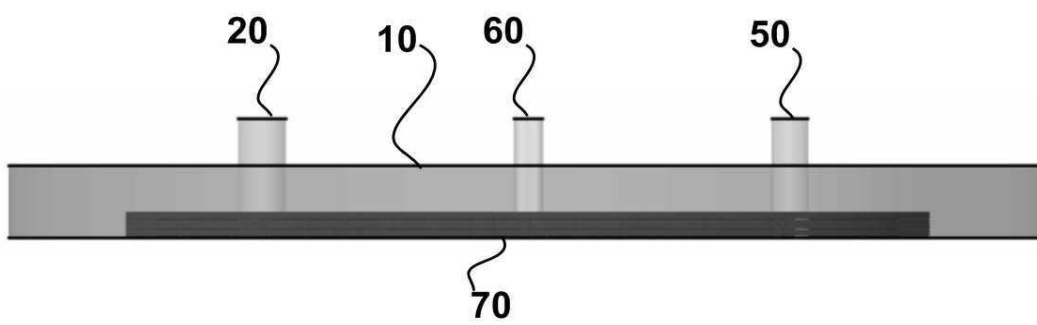
- [0106] 10; 베이스 20; 리저버어
- 30; 유동 채널 40; 챔버
- 50; 펌핑부 60; 진공 튜브
- 70; 고정 채널

도면

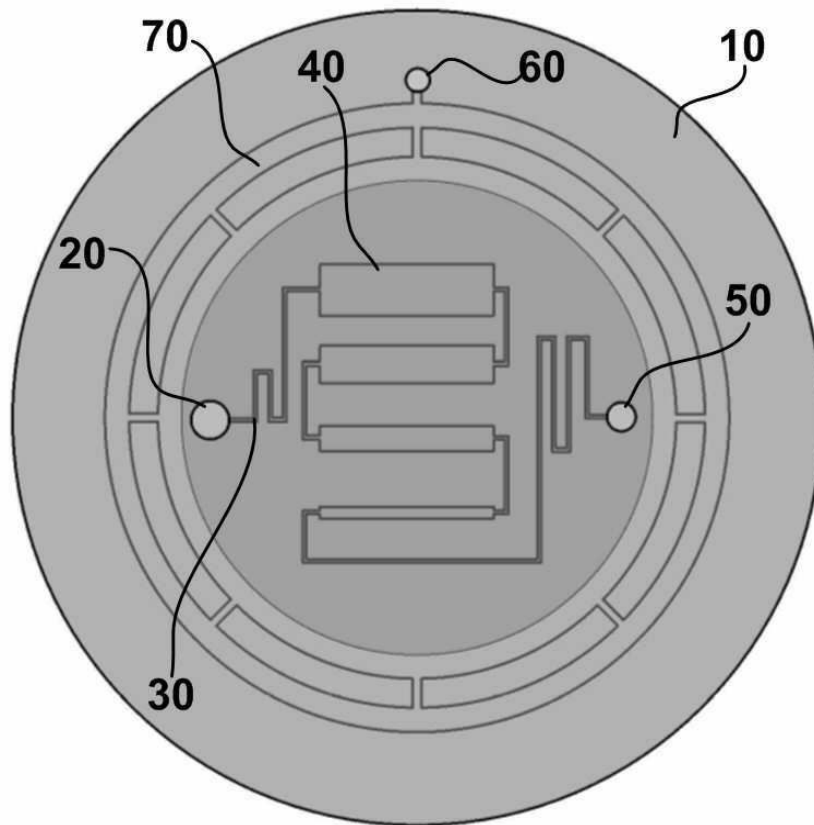
도면1



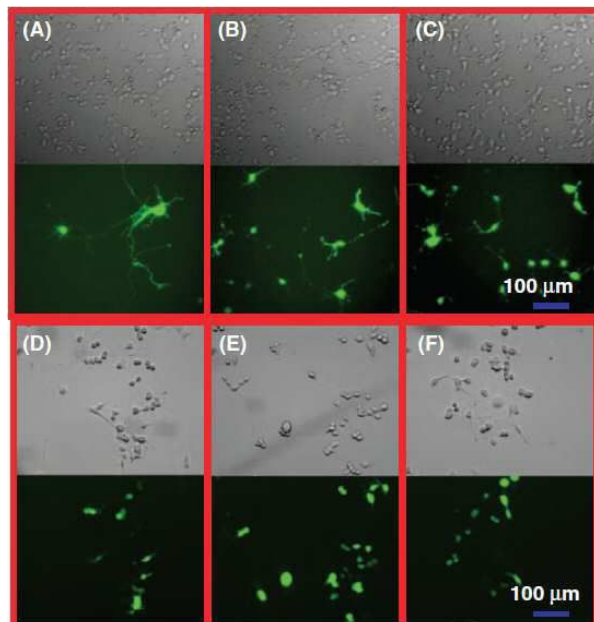
도면2



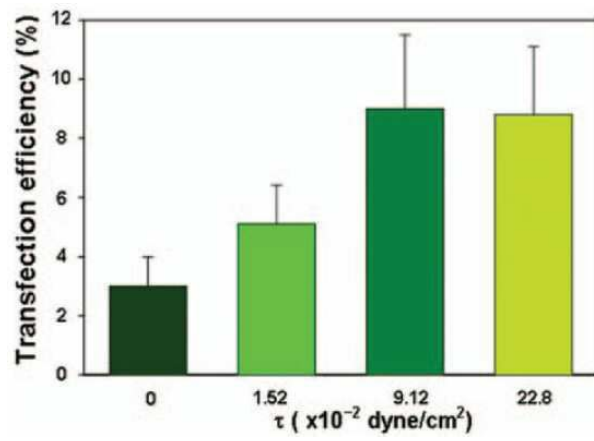
도면3



도면4



도면5



도면6

