



등록특허 10-2428464



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월03일
(11) 등록번호 10-2428464
(24) 등록일자 2022년07월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/42 (2017.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 13/00 (2017.01) *C12N 15/87* (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01) *C12N 5/07* (2010.01)
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 5/074* (2010.01)
C12N 5/075 (2010.01) *C12N 5/076* (2010.01)
G01N 35/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12M 1/42 (2013.01)
C12N 1/20 (2021.05)
- (21) 출원번호 10-2015-0178183
- (22) 출원일자 2015년12월14일
심사청구일자 2020년11월23일
- (65) 공개번호 10-2016-0079660
- (43) 공개일자 2016년07월06일
- (30) 우선권주장
1020140191302 2014년12월28일 대한민국(KR)

- (56) 선행기술조사문헌
Choudhury. Continuous flow single cell electroporation in an ultrafast laser inscribed optofluidic device. 2012 International conference of fiber optics and photonics. 2013.6.25. 1부.*
Geng. Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery. Lab on a Chip. 2013, 13, 3803-3821 1부.*
JP2002516678 A
JP2005510236 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 12 항

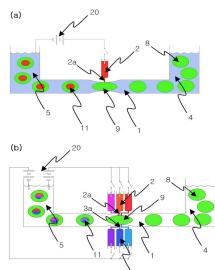
심사관 : 이진우

(54) 발명의 명칭 세포에 물질을 주입하여 세포를 변환시키는 방법

(57) 요약

본 발명은, 단일고체 내부에 형성시킨 세포가 통과하는 제1통로; 상기 세포에 주입할 물질이 통과하며 상기 제1통로의 양 말단 사이의 임의의 위치에서 상기 제1통로에 연결되며 상기 단일고체 내부에 형성되는 제2통로; 및 상기 제1통로와 상기 제2통로 사이에 압력 차나 전위차를 인가하는 세포에 물질을 주입하는 장치를 사용하여,

(뒷면에 계속)

대 표 도

1) 상기 제1통로에 세포들을 함유하는 유체를 유입시키면서, 상기 제2통로에 단백질, 웨타이드, 유전자, 바이러스, 약물, 유기 화합물, 무기 화합물, 클라렌, 세포핵, 미토콘드리아, 소포체, 골지체, 리소좀, 리보솜, 나노입자 또는 이들의 혼합물을 유입시키는 단계; 그리고 2) 상기 제2통로에 전위차를 가하여 상기 제1통로와 제2통로가 연결된 지점을 통과하는 단일 세포에 상기 물질을 주입하는 단계를 포함하는, 세포를 변환시키는 방법에 대한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 13/00 (2013.01)
C12N 15/87 (2013.01)
C12N 5/04 (2013.01)
C12N 5/06 (2022.05)
C12N 5/0606 (2013.01)
C12N 5/0609 (2013.01)
C12N 5/061 (2013.01)
C12N 5/0696 (2013.01)
G01N 35/08 (2013.01)

이) 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415140586
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	글로벌전문기술개발사업(주력및신산업)
연구과제명	미세유체역학 기술을 이용한 진핵 세포 형질 전환 연구용 물질 주입 장치 개발
기여율	1/3
과제수행기관명	주식회사 웨토바이오메드
연구기간	2015.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

단일고체 내부에 형성된 세포가 통과하는 제1통로;

상기 세포에 주입할 물질이 통과하며 상기 제1통로의 양 말단 사이의 임의의 위치에서 상기 제1통로에 연결되고
상기 단일고체 내부에 형성된 제2통로;

상기 제1통로와 연결되는 제1전극; 및 상기 제2통로와 연결되는 제2전극을 사용하여, 상기 제1전극과 상기 제2전극에 의해 상기 제1통로와 상기 제2통로에 전위차를 인가하여, 1)상기 제1통로에 세포들을 함유하는 유체를 유입시키면서, 상기 제2통로에 세포에 주입할 물질을 유입시키는 단계; 그리고 2)상기 제2통로에 전위차를 가하여 상기 제1통로와 제2통로가 연결된 지점을 통과하는 단일 세포에 상기 물질을 주입하는 단계를 포함하는, 세포 변환 방법.

청구항 2

제1항의 방법에 있어서, 상기 물질이, 단백질, 펩타이드 당단백, 지단백, DNA, RNA, 앤티센스 RNA, siRNA, 뉴클레오타이드, 리보자임, 플라스미드, 염색체, 바이러스, 약물, 유기 화합물, 무기 화합물, 히알루론산, 콜라겐, 세포핵, 미토콘드리아, 소포체, 골지체, 리소좀, 리보솜 또는 나노 입자 그리고 이들의 혼합물을 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 3

제1항의 방법에 있어서,

상기 세포는,

세균 및 고세균으로 이루어진 군으로부터 선택되는 원핵세포; 또는

동물세포 및 식물세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 진핵세포인 것을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 4

제3항의 방법에 있어서,

상기 동물세포는,

상피세포, 근육세포, 신경세포, 지방세포, 골세포, 적혈구, 백혈구, 림프구 및 점막세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 체세포;

난자 및 정자로 이루어진 군으로부터 선택되는 생식세포; 및

성체줄기세포 및 배아줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 조혈모세포, 중간엽줄기세포, 신경줄기세포, 섬유아세포, 간아세포, 망막아세포, 지방유래 줄기세포, 골수유래 줄기세포, 제대혈유래 줄기세포, 제대유래 줄기세포, 태반유래 줄기세포, 양수유래 줄기세포, 말초혈관유래 줄기세포 및 양막유래 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 6

제1항의 방법에 있어서, 상기 세포가 상기 제1통로의 양 말단 간의 전위차에 의해 이동하는 것을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 7

제1항의 방법에 있어서, 상기 제1통로와 상기 제2통로 사이의 전위차가 0.5V 내지 100V인 것을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 8

제7항의 방법에 있어서, 상기 제1통로와 상기 제2통로 사이의 전위차가 0.8V 내지 50V인 것을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 9

제8항의 방법에 있어서, 상기 제1통로와 상기 제2통로 사이의 전위차가 1.0V 내지 10V인 것을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 10

제1항의 방법에 있어서, 상기 제2통로가 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 11

제1항의 방법에 있어서, 상기 제1 전극은 (-)전극이며, 상기 제2 전극은 (+)전극인 것을 특징으로 하는, 세포 변환 방법.

청구항 12

단일고체 내부에 형성된 세포가 통과하는 제1통로; 상기 세포에 주입할 물질이 통과하며 상기 제1통로의 양 말단 사이의 임의의 위치에서 상기 제1통로에 연결되고 상기 단일고체 내부에 형성된 제2통로;

상기 제1통로와 연결되는 제1전극; 및

상기 제2통로와 연결되는 제2전극을 사용하여,

상기 제1전극과 상기 제2전극에 의해 상기 제1통로와 상기 제2통로에 전위차를 인가하여, 1)상기 제1통로에 세포들을 함유하는 유체를 유입시키면서, 상기 제2통로에 세포에 주입할 물질을 유입시키는 단계; 그리고 2)상기 제2통로에 압력차를 가하여 상기 제1통로와 제2통로가 연결된 지점을 통과하는 단일 세포에 상기 물질을 주입하는 단계를 포함하는, 세포 변환 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 단일 세포에 유전자나 단백질과 같은 물질을 주입하여 세포를 변환시키는 방법에 관한 것이다.

[0002] 보다 상세하게는, 본 발명은, 단일고체 내부에 형성된 세포가 통과하는 제1통로; 상기 세포에 주입할 물질이 통과하며 상기 제1통로의 양 말단 사이의 임의의 위치에서 상기 제1통로에 연결되고 상기 단일고체 내부에 형성된 제2통로; 및 상기 제1통로와 상기 제2통로에 압력 차 또는 전위차를 인가하는, 세포에 물질을 주입하는 장치를 사용하여, 1)상기 제1통로에 세포들을 함유하는 유체를 유입시키면서, 상기 제2통로에 단백질, 웨타이드 당단백, 지단백, DNA, RNA, 리보자임, 염색체, 바이러스, 유기 화합물, 무기 화합물, 콜라겐, 세포핵, 미토콘드

리아, 소포체, 골지체, 리소좀, 리보솜, 나노 입자 또는 이들의 혼합물을 유입시키는 단계; 그리고 2)상기 제2통로에 전위차를 가하여 상기 제1통로와 제2통로가 연결된 지점을 통과하는 단일 세포에 상기 물질을 주입하는 단계를 포함하는, 세포를 변환시키는 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [0003] 바이오 분야, 전기전자 분야 및 나노 가공 분야 기술의 눈부신 발전에 힘입어 이를 분야의 융합을 통한 새로운 바이오 의료 기술에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다.
- [0004] 세포 조작 분야에서는 체외에서 환자의 세포를 조작한 후 환자의 체내에 주입하여 치료 목적으로 사용하려는 시도와 인간의 세포를 조작하여 차세대 신약 개발 및 타겟 검증에 사용하려는 연구가 다수 진행되고 있다.
- [0005] 최근의 세포 조작 기술은 유용한 세포치료제 개발에 초점을 맞추고 있는데, 특히, 야마나카 인자(Yamanaka factor)를 이용한 역분화 유도만능 줄기세포(iPS)를 활용하려는 노력이 크게 주목받고 있다.
- [0006] 야마나카 인자는 4개의 유전자들(Oct3/4, Sox2, cMyc 및 Klf4)을 지칭한다. 야마나카 인자를 바이러스유래 벡터를 이용하여 세포의 염색체에 삽입하면 분화가 이미 끝난 체세포가 다양한 종류의 체세포로 분화가 가능한 만능 줄기세포로 바뀐다. 따라서 유도만능 줄기세포는 배아줄기세포의 윤리 및 생산성 문제점과, 성체줄기 세포의 분화 한계성을 모두 극복할 수 있는 혁신적인 기술로 평가 받는다.
- [0007] 그러나, 바이러스 유래 벡터를 세포에 사용하기는 안전에 대한 우려를 발생시킨다. 또한, 바이러스로부터 유래된 벡터를 함유하고 있는 유도만능 줄기세포로부터 분화된 세포나 조직을 인체에 이식할 경우 종양을 유발시킬 위험도 있다.
- [0008] 이러한 문제점을 해결하고 혁신적인 유도만능 줄기세포를 이용하여 유용한 세포치료제를 개발하려면, 바이러스 유래 벡터와 같은 전달 수단을 사용하지 아니한 채 DNA나 RNA, 폴리펩타이드, 나노입자 등과 같은 물질을 단일 세포에 직접 주입할 수 있는 새로운 세포변환 조작 기술이 필요하다.
- [0009] 바이러스 유래의 벡터와 같은 전달 수단을 사용하지 아니하는 세포 변환 조작을 위한 종래의 방법은, 세포에 전기장을 가하거나, 세포를 화학적으로 처리하거나, 기계적 전단력을 가하여 세포막에 손상을 가하여 세포 외부 액체에 포함된 유전자 등과 같은 물질이 세포 내로 유입될 수 있도록 하고, 세포의 자가 치유력에 의존하여 손상되었던 세포벽이 복원되어 세포가 죽지 않고 생존하기를 기대하는 방법이 주류를 이루고 있다.
- [0010] 입자 충돌 방법이나 마이크로 주입 방법, 전기천공 방법과 같은 다양한 세포 변환 방법들이 개발되고 있다. 마이크로 주입 방법을 제외하고는, 이들 방법들은 다수의 유전자나 폴리펩타이드를 다양에 기초한 통계확률적인 (bulk stochastic)과정에 의해 임의로 세포에 유입시키는 방법에 기초 하고 있다.
- [0011] 세포를 변환시키기 위하여 현재 가장 널리 사용중인 이러한 종래의 벌크 전기천공(bulk electroporation) 방법으로는 주입량의 정밀한 제어가 불가능하다는 단점이 있다.
- [0012] 따라서, 개개의 세포에 미세유체 역학에 기초하여 전기천공으로 물질을 주입하는(microfluidics-based electroporation) 방법이 새로운 기술로 등장하고 있다. 이러한 미세유체 전기천공법은 벌크 전기천공법에 비하여 천공을 위한 전압을 낮출 수 있다는 점, 세포변환 효율이 높다는 점, 세포 생존율을 크게 끌어 올릴 수 있다는 점 등을 포함하는 몇 가지의 중요한 장점이 있다.
- [0013] 2011년에, 나노 채널에 인접하여 위치하는 세포 막의 좁은 영역을 매우 큰 국소적 전기장에 노출시키는 나노 채널 전기천공 기술이 일반에 공개된 바 있다(L. James Lee et al, "Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cell", Nature Nanotechnology vol. 6 November 2011, www.nature.com /naturenanotechnology published online 16, October, 2011,).
- [0014] 상기 나노 채널 전기천공 장치는 나노 채널을 통해 연결되는 두 개의 마이크로 채널을 포함한다. 변환시킬 세포는 나노 채널에 달려있는 마이크로 채널에 채워지고 또 다른 마이크로 채널에는 주입될 물질이 채워진다. 마이크로 채널-나노 채널-마이크로 채널로 연계되는 구조는 각각의 세포를 정확한 위치에 놓여 지게 한다. 수 밀리초간 지속 되는 하나 이상의 전압 펄스가 두 개의 마이크로 채널간에 인가되어 세포의 변환을 야기한다. 주입량의 조절은 지속 시간과 펄스의 숫자를 조정함으로써 이루어진다.
- [0015] 그런데, 상기의 선행 기술 논문에 기재된 나노 채널 전기천공 주입 장치는, 칩 기판 위에 각인되어 형성된 수지로 제작된 마이크로 채널과 나노 채널을 덮어주는 폴리디메틸실록산으로 제작된 덮개 판을 포함한다.

[0016] 상기 네이처 나노테크놀로지에 게재된 선행기술 논문에 기재된 나노 채널 전기천공 장치는, 각인되어 형성되는 고분자 수지로 제작된 마이크로 채널과 나노 채널 충과 폴리디메틸실록산 덮개 판간에 틈새의 발생을 피할 수 없다. 그러한 이유는 기계적 물성이 서로 상이한 재료들로 만들어진 덮개 판과 채널 형성 충간의 밀봉은 절대 완전할 수 없기 때문이다.

[0017] 또한, 폴리디메틸실록산으로 제작되는 덮개 판과 고분자 수지로 제작되는 마이크로 채널과 나노 채널들의 기계적 칫수 안정성이 매우 낮기 때문에 상기 덮개 판과 채널 충간의 밀봉은 완전할 수가 없다. 따라서, 상기 덮개 판과 채널 충간에 틈새가 쉽게 생성될 수 있다.

[0018] 이렇게 발생하는 틈새는 용액의 침투를 허용하여 나노 채널 전기천공 칩을 오염시키는 한편 채널 간의 세포의 이동과 세포로의 물질의 주입을 위하여 가해지는 압력 차이나 전기장에 다양한 오차를 발생시킬 수 있다.

[0019] 따라서, 이 기술 분야에서는, 이상과 같은 선행기술의 문제점들을 극복하기 위하여, 개별의 세포에 다양한 물질을 주입함에 있어서, 오차 없이 다종의 물질을 각 세포 별로 일시에 주입하는 새로운 기술의 개발이 오랫동안 기대되어 왔다.

[0020] 본 발명자는, 유리와 같이 딱딱한 고체 내부에 다수의 마이크로 채널과 이에 연결되는 다수의 나노 채널을 형성하고 이들에 전위차를 가할 수 있는 전극을 설치함으로써, 사용되는 소재들의 칫수 안정성 문제점이나 접합 부위의 밀봉의 불완전함으로 인하여 발생하는 틈새로 인한 종래의 기술의 여러 문제점들을 극복할 수 있음에 착안하여, 본 발명의 세포 변환 방법을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 따라서, 본 발명의 목적은, 단일고체 내부에 형성시킨 세포가 통과하는 제1통로; 상기 세포에 주입할 물질이 통과하며 상기 제1통로의 양 말단 사이의 임의의 위치에서 상기 제1 통로에 연결되며 상기 단일고체 내부에 형성되는 제2통로; 및 상기 제1 통로와 상기 제2통로에 압력 차나 전위차를 인가하는, 세포에 물질을 주입하는 장치를 사용하여, 1) 상기 제1통로에 세포들을 함유하는 유체를 유입시키면서, 상기 제2통로에 단백질, 웨타이드 당단백, 지단백, DNA, RNA, 앤티센스 RNA, siRNA, 뉴클레오타이드, 리보자임, 플라스미드, 염색체, 바이러스, 약물, 유기 화합물, 무기 화합물, 히알루론산, 콜라겐, 세포핵, 미토콘드리아, 소포체, 골지체, 리소좀, 리보솜 또는 나노 입자 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 물질을 유입시키는 단계; 그리고 2) 상기 제2통로에 전위차를 가하여 상기 제1통로와 제2통로가 연결된 지점을 통과하는 단일 세포에 상기 물질을 주입하는 단계를 포함하는, 세포를 변환시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 이상의 본 발명의 목적은, 단일고체 내부에 형성시킨 세포가 통과하는 제1통로; 상기 세포에 주입할 물질이 통과하며 상기 제1통로의 양 말단 사이의 임의의 위치에서 상기 제1통로에 연결되며 상기 단일고체의 내부에 형성된 제2통로; 및 상기 제1통로와 상기 제2통로에 압력 차나 전위차를 인가하는, 세포에 물질을 주입하는 장치를 사용하여, 제1통로를 따라 이동하는 단일 세포가 상기 제1통로와 상기 제2통로가 연결되는 지점을 통과할 때 제2통로에 전위차를 가하거나 또는 제2통로와 제1통로에 전위차를 가하여, 상기 세포에 상기 제2통로를 통해 유입되는 물질을 주입하여, 상기 세포를 변환시키는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.

[0023] 본 발명의 방법으로 물질을 주입하여 변환시키는 세포는, 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 원핵세포는 세균(bacteria) 또는 고세균(archaea)일 수 있고, 상기 진핵세포는 동물세포, 곤충세포 또는 식물세포일 수 있다.

[0024] 본 발명의 하나의 실시예에서는, 상기 동물세포가 체세포, 생식세포 또는 줄기세포일 수 있다. 구체적으로, 상기 체세포는 상피세포, 근육세포, 신경세포, 지방세포, 골세포, 적혈구, 백혈구, 림프구 또는 점막세포일 수 있다. 또한, 상기 생식세포는 난자 또는 정자일 수 있다. 더욱이, 상기 줄기세포는 성체줄기세포 또는 배아줄기세포일 수 있다.

[0025] 본 발명의 하나의 실시예에서는, 상기 성체 줄기세포는 조혈모세포, 중간엽 줄기세포, 신경줄기세포, 섬유아세포, 간아세포, 망막아세포, 지방유래 줄기세포, 골수유래 줄기세포, 제대혈유래 줄기세포, 제대유래 줄기세포, 태반유래 줄기세포, 양수유래 줄기세포, 말초혈관유래 줄기세포 또는 양막유래 줄기세포일 수 있다.

- [0026] 본 발명의 세포 내부로의 물질 주입 방법을 통해 세포 내부로 주입할 수 물질은 단백질, 펩타이드 당단백, 지단백, DNA, RNA, 앤티센스 RNA, siRNA, 뉴클레오타이드, 리보자임, 플라스미드, 염색체, 바이러스, 약물, 유기 화합물, 무기 화합물, 히알루론산, 콜라겐, 세포핵, 미토콘드리아, 소포체, 골지체, 리소좀, 리보솜 또는 나노입자, 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0027] 세포에 물질을 주입하기 위하여 본 발명의 방법에 사용되는 장치는 대한민국 특허출원 제10-2014-0191302호와 제10-2015-0178130호에 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 방법에 사용될 장치를 제작하기 위하여, 세포를 함유하는 유체가 이동하는 다수의 마이크로 채널과 나노 채널을 웨토초 레이저를 사용하여 유리 고체 내부에 형성시킬 수 있다.
- [0028] 2000년 이후 최근 급속하게 발전한 미세 유체역학 분야는 바이오 및 의료용 유체 칩에 관한 것을 핵심 내용으로 다루는 분야이다. 이러한 유체 칩에는 복잡한 미세 유체 통로들이 얹혀있으며, 다양한 표면 개질이 가해지고, 내부 전극에 전압을 인가하여 전기화학적 현상들을 유도하고, 압력 구배 및 전기 삼투압 현상으로 유체 흐름이 구동되는 매우 복잡한 기구이다.
- [0029] 유체 칩이 만족시켜야 하는 다양한 조건들은 특히 유리 소재를 사용했을 때 가장 이상적으로 만족시킬 수 있는데, 이는 오랜 시간 의료 분야에서 주요 재료로 사용되어오면서 안전성이 검증되었기 때문이다. 구체적으로는 유리는 바이오 적합성, 내화학성, 전기 절연성, 치수 안정성, 구조 강성, 접합 강도, 친수성, 투명성 등 그 장점이 매우 다양하다.
- [0030] 다만, 종래의 유체 칩 제조가 반도체 공정인 식각 공정을 통하여 대부분 이루어지기 때문에 등방성 식각에 따른 가공 해상도의 한계, 종횡비율의 제한, 가공 단면을 다양하게 할 수 없는 제한, 식각 후 접합 공정의 어려움 등 연구 개발 분야 등 소규모 단품종 개발 등에 어려움이 크다.
- [0031] 이러한 어려움으로 인해, 액상으로 형틀에 부어서 굳혀 만드는 PDMS (polydimethylsiloxane) 실리콘 고무를 이용한 유체 칩 제조가 광범위하게 이루어지고 있었다. PDMS 재료를 사용할 경우, 칩 제조가 순쉬운 장점이 있으나, 의료용 재료로 적용하기에 바이오 적합성이 유리 소재 보다 떨어지며, 내화학성이 낮고, 치수 안정성, 구조 강성, 접합 강도가 매우 취약하다.
- [0032] 특히, 유체 칩에 적용할 경우, 유리 바닥 면과의 접합 강도가 낮아 내부 유체가 새어 나오기 쉬우며, 높은 전기장을 가할 경우 접합 면을 타고 전류가 누설되기 쉬워 전기화학적인 적용을 하기에 제한이 크게 따른다. 또한, 소수성 표면 특성으로 인해 바이오 적합성을 높이기 위해 표면 개질이 필요한데, 플라즈마 산화를 통해 한시적인 친수 표면으로의 개질을 하는 것은 가능하다.
- [0033] 이런 이유로, 의료 목적의 유체 칩, 특히 세포를 조작하는 경우와 같은 높은 바이오 적합성이 요구되는 경우는 유리 소재의 적용이 크게 요구된다. 또한, 세포 조작을 위해 필요한 압력 및 전압의 다양한 적용을 안전하게 수행하려면 구조의 강성, 접합 면의 접합 강도, 치수 안정성 등이 높은 소재가 요구되어, 유리 소재 및 이와 유사한 특성을 가지는 투명성 고체를 소재로 적용할 필요성이 크다.
- [0034] 특히, 소재의 가격과 특성을 모두 고려할 때, 사실상 유리 소재가 가장 이상적인 소재이기 때문에 유리 소재의 가공과 접합의 어려움과 한계를 극복하는 새로운 가공 방법의 개발이 매우 중요하다.
- [0035] 기존의 유리를 이용한 유체 칩의 제조는 한쪽 유리 판 소재에 미세 유체 채널을 식각에 의해 가공하고, 또 다른 유리판 (주로 식각이 없는 평판구조)과 접합을 통해 이루어진다.
- [0036] 이러한 식각 및 접합 공정에 의한 제조의 한계점은 1) 등방성 식각에 따른 치수, 종횡비, 단면 형상 제약과 2) 유리-유리 간 접합의 어려움과 한계가 가장 큰 문제점이다. 특히, 1미크론 수준에서 나노미터 수준의 초 미세 형상 제조가 상기 문제점들로 인해 사실상 불가능해지게 되는데, 이를 해결하기 위해서는 접합 공정이 필요 없는 가공 공정이 가장 필요하다.
- [0037] 웨토초 레이저 삼차원 나노 가공 공정은 2004년 미국 미시간 대학교에서 처음으로 웨토초 레이저 필스를 이용한 나노 가공 현상을 발견하고, 이 후 삼차원 나노 가공 공정으로 발전하게 되었다. 본 방법을 이용하게 되면 나노 스케일의 삼차원 구조를 유리 내부에 바로 가공할 수 있게 되어, 접합 공정이 없이 유체 칩을 제조할 수 있게 된다.
- [0038] 가공의 편의상, 유체 칩의 대부분을 차지하는 마이크로 스케일의 2차원 유체 구조는 기존의 식각 공정과 접합 공정으로 제조하고, 나노 구조들만 웨토초 레이저를 이용하여 삼차원 가공하는 방법이 더 효율적일 수 있다.

- [0039] 다만, 나노 스케일의 완전한 삼차원 구조는 펨토초 레이저 삼차원 나노 공정으로만 가능하며, 기존의 식각 및 접합 공정으로는 사실상 제조가 불가능하다.
- [0040] 본 발명의 세포에 물질을 주입하는 방법에 사용되는 장치에 형성된 상기 제1통로는 양 말단에서 중간 부분 방향으로 내경이 점진적으로 감소하는 형상을 가질 수 있다. 또한, 상기 제1통로의 양 말단의 내경은 $10\text{ }\mu\text{m}$ 내지 $200\text{ }\mu\text{m}$ 이고, 상기 제1통로의 중간 좁아진 부분의 내경은 $3\text{ }\mu\text{m}$ 내지 $150\text{ }\mu\text{m}$ 일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 세포 내부로의 물질 주입 방법에 사용된 장치에 형성되는 상기 제2통로는 하나 이상일 수 있다. 또한, 상기 제2통로의 내경은 10nm 내지 $1,000\text{nm}$ 일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 방법에 사용되는 장치에서, 세포는 상기 제1통로의 양 말단 간의 압력 차 또는 전위차에 의해 이동될 수 있다. 예를 들면, 상기 제1통로의 양 말단 사이에 압력 차이를 발생시키기 위해 펌프를 사용할 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 제1통로의 양 말단 사이에 전위차를 발생시키기 위해 직류 전원 또는 교류 전원을 사용할 수 있고, 펠스 형태의 전압을 적용할 수도 있다. 특히, 상기 제1 통로의 양 말단 사이의 전위차는 바람직하게는 $10V$ 내지 $1,000V$, 보다 바람직하게는 $15V$ 내지 $500V$, 가장 바람직하게는 $20V$ 내지 $200V$ 일 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 제1통로와 상기 제2통로에 가해지는 전위차는, 바람직하게는 $0.5V$ 내지 $100V$, 보다 바람직하게는 $0.8V$ 내지 $50V$, 가장 바람직하게는 $1.0V$ 내지 $10V$ 일 수 있다.
- [0045] 상기 제1통로는 양 말단에서 중간 부분 방향으로 내경이 점진적으로 감소하는 형상을 가질 수 있다. 또한, 상기 제1통로의 양 말단의 내경은 $10\text{ }\mu\text{m}$ 내지 $200\text{ }\mu\text{m}$ 이고, 상기 제1통로의 중간 부분의 내경은 $3\text{ }\mu\text{m}$ 내지 $150\text{ }\mu\text{m}$ 일 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 제2통로는 하나 이상일 수 있다. 또한, 상기 제2통로의 내경은 10nm 내지 $1,000\text{nm}$ 일 수 있다.
- [0047] 또한, 상기 제1통로와 상기 제2통로 사이의 전위차는, 바람직하게는 $0.5V$ 내지 $100V$, 보다 바람직하게는 $0.8V$ 내지 $50V$, 가장 바람직하게는 $1.0V$ 내지 $10V$ 일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 방법을 통하여, 현미경을 통해 세포를 움직임을 확인하면서, 압력 차 또는 전위차를 조절하여 상기 세포의 상기 제1통로로의 유입을 효과적으로 제어할 수 있다.
- [0049] 또한, 상기 제1통로와 상기 제2통로 사이에 가해지는 전위차를 조절하여 상기 세포 내부로 주입되는 물질의 양을 조절할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 하나의 실시예에 따르면, 세포에 주입되는 물질의 양은 (i)주입할 물질에 형광 물질을 표지한 후 형광 강도를 측정하거나, (ii) 물질을 주입할 때 발생하는 전류의 양을 측정하여 계산될 수 있다.

발명의 효과

- [0051] 본 발명의 방법을 통하여, 단백질, 유전자, 약물, 나노 입자 등 다양한 물질을 세포에 주입할 수 있다. 특히, 본 발명의 방법으로는 단일 세포에 주입되는 물질의 양을 전위차를 이용하여 조절할 수 있기 때문에, 주입 수율이 매우 높고 세포들 간의 주입량이 차이 나지 아니하게 제어할 수 있다. 따라서, 수많은 다양한 세포조작과 유도만능 줄기세포를 포함하는 세포치료제의 연구와 개발에 본 발명의 세포변환 방법이 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 본 발명의 방법에 사용되는, 하나의 물질 통로(제2통로)를 갖는 세포 내부로의 물질 주입 장치(도1a)와, 6개의 제2통로를 갖는 세포 내부로의 물질 주입 장치(도1b)에 대한 개략도이다.
- 도 2는 본 발명의 방법에 사용되는, 세포 내부로의 물질 주입 장치의 확대 개략도이다.
- 도 3은 도 2의 세포 내부로 물질을 주입하는 장치에서 제1통로 및 제2통로에 대한 3차원 구조(도3a)와 제1통로와 제2통로가 연결되는 부분에 대한 확대도(도3b)이다.
- 도 4는 본 발명의 방법에 따라 세포에 물질을 주입하는 과정을 설명하는 도면이다.
- 도 5는 본 발명의 세포에 물질을 주입하는 방법에 사용된 장치의 20배 확대 현미경 사진이다.
- 도 6은 유리 내부에 형성시킨 본 발명에 사용된 물질 주입 장치의 외관 사진이다.
- 도 7는 실시예2에서 본 발명의 방법으로 인간 폐포 기저 상피세포(ATCC CCL-185)에 적색 형광 단백질을 주입하

는 과정을 촬영한 형광 현미경(TE2000-U, Nikon) 사진들이다.

도 8은 실시예3에서 본 발명의 방법으로 사용하여 인간 제대혈 유래 줄기세포에 적색 형광 단백질을 주입하는 과정에 대한 형광 현미경 사진들이다.

도 9는 실시예4에서 본 발명의 방법으로 인간 태반 유래 줄기세포에 적색 형광 단백질을 주입하는 과정에 대한 형광 현미경 사진이다.

도 10은 실시예5에서 본 발명의 방법으로 인간 폐포 기저 상피세포(ATCC CCL-185)에 플라스미드 DNA(cy3)를 주입한 다음 12시간 경과된 이후의 사진이다.

도 11은 실시예1에서 본 발명의 방법에 사용되는 장치를 제작하기 위하여 사용된, 유리(23) 내부에 3차원 구조의 마이크로 채널과 나노 채널을 형성시는 펨토초 레이저 가공 장치의 분해사시도 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053]

이하, 다음의 도면 및 실시예들을 통하여 본 발명의 방법을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 다음의 도면 및 실시예들에 대한 설명은 본 발명의 구체적인 실시 태양을 특정하여 설명하고자 의도하는 것일 뿐이며, 본 발명의 권리범위를 이들에 기재된 내용으로 한정하거나 제한 해석하고자 의도하는 것은 아니다.

[0054]

실시예 1

[0055]

펨토초 레이저를 사용하여 유리 내부에 마이크로 채널과 나노 채널을 형성시켜 본 발명의 방법에 사용되는 장치를 제작하는 과정.

[0056]

도11에 나타낸 펨토초 레이저(21) (Pharos, 4W, 190fs, frequency doubled 510nm, DPSS chirped pulse amplification laser system)의 레이저 펄스를 대물렌즈 (22) (from 40× to 100×, N.A. from 0.5 - 1.3, Olympus & Zeizz)를 통해 하나의 단일 유리 소재 (23) (borosilicate glass, Corning)의 바깥 표면으로부터 내부까지 초점이 형성되도록 하였다. 유리 소재는 3축 나노 선형 이송기구 (100×100×100 μm³, ±1nm, Mad City Labs, Inc. Madison, WI)에 설치하여 레이저 초점에 대해서 삼차원적으로 움직일 수 있도록 하였다.

[0057]

표면에 형성된 레이저 초점이 유리 소재의 내부로 들어가면 초점이 지나는 패스를 따라서 유리 소재가 제거되면서 삼차원 구조물이 형성되도록 하였다. 삼차원 구조물은 수치 코드를 생성하여 3축 나노 선형 이송기구를 제어하도록 하였으며, CCD카메라 (24)를 설치하여 모니터링 하였다. 구조물을 가공하는 최소 크기는 이론상 10nm까지 가능하며, 본 실시예에서는 약 200nm의 크기로 가공하였다. 광학적 조작을 통해 가공되는 채널의 내경은 이보다 더 커질 수도 있으며, 더 작아질 수도 있었다. 투명한 재료인 유리 소재 내부에 삼차원 채널을 형성하였기 때문에 모든 삼차원 형태의 채널들을 제한 없이 형성시킬 수 있었다.

[0058]

실시예 2

[0059]

본 발명의 방법에 따라 인간 폐포 기저 상피 세포에 적색 형광 단백질을 주입하는 과정

[0060]

적색 형광 단백질(dsRed fluorescence protein, MBS5303720)을 1mg/ml 농도로 희석 (용매: PBS, Hyclone, SH30028.02, pH 7.4)하여 혼탁액을 준비하였다. A549 (ATCC CCL-185, human alveolar basal epithelial cells) 세포를 10% FBS DMEM (high glucose)를 사용하여 incubator에서 계대 배양 (humidified 5% CO₂, 37 °C) 하였다.

[0061]

T-flask에서 배양된 세포를 TrypLE (gibco)를 이용하여 분리하였다. 1 mM EDTA in D-PBS (gibco) solution으로 교체하였다. Debris 제거를 위해 40 μm cell strainer (BD)를 이용하여 필터를 한 후 Calcein-AM으로 37°C incubator에서 15분 동안 염색하였다. 1mM EDTA in D-PBS로 교체한 후 혈구측정기 (hemocytometer)를 이용하여 2 x 10⁶ cells/ml 농도로 A549 세포혼탁액을 준비하였다.

- [0062] A549 세포현탁액과 적색 형광 단백질(RFP) 혼탁액을 각각 1ml 주사기에 담았으며, 각각의 주사기는 실리콘 투브를 통해 세포 로딩 채널과 물질 로딩 채널의 입구에 연결하였고, 주사기 조작을 통해 채널 내부로 주입 조작하였다. 세포 및 물질 로딩 채널의 반대쪽 입구에는 PBS로 채워진 1ml 주사기를 실리콘 투브를 통해 동일하게 연결하여, 물질 주입 구조물로 세포를 선택적으로 집어넣을 수 있도록 구성하였다.
- [0063] 세포 로딩 채널 양단에 연결된 세포현탁액과 PBS가 들어있는 1ml 주사기를 조작하여, 목표 세포를 물질 주입 구조물 내부로 밀어 넣은 후, 물질 주입 나노 통로와 만나는 중앙에 위치시켰다.
- [0064] 이 후, 물질 로딩 채널 양단에 설치한 전극 인가장치에 전압을 걸어주어, 물질 주입 통로를 따라서 1.76V가 형성되도록 하고, 3초간 전압을 걸어 주었다.
- [0065] 오실로스코프(VDS3102, Owon)를 이용하여 전압을 측정하였다. 형광현미경 (TE2000-U, Nikon)을 통해 세포의 위치를 파악하고, 적색 형광 단백질 주입 과정을 촬영하여 도 7에 나타내었다.

[0066] 실시예 3

본 발명의 방법에 따라 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포에 적색 형광 단백질을 주입하는 과정

- [0068] 적색 형광 단백질(dsRed fluorescence protein, MBS5303720)를 1mg/ml 농도로 희석 (용매: PBS, Hyclone, SH30028.02, pH 7.4)하여 혼탁액을 준비하였다. 인간 제대혈 유래 중간엽 줄기세포는 분당 차병원에서 분양 받아 구축한 세포 주를 사용하였다. 배양 배지는 MEM-alpha (Gibco), 10% FBS (Hyclone), 25 ng/ml FGF-4 (Peprotech), 1 ug/ml Heparin (Sigma)를 사용하였고, humidified 5% CO₂, 37°C incubator에서 계대 배양하였다.
- [0069] T-flask에서 배양된 세포를 TrypLE (gibco)를 이용하여 분리하였다. 1mM EDTA in D-PBS (gibco) solution으로 교체하였다. Debris 제거를 위해 40 μm cell strainer (BD)를 이용하여 필터를 한 후 Calcein-AM으로 37°C incubator에서 15분 동안 염색하였다. 1mM EDTA in D-PBS로 교체한 후 혈구측정기 (hemocytometer)를 이용하여 2×10^6 cells/ml 농도로 제대혈 유래 줄기세포 혼탁액을 준비하였다.
- [0070] 제대혈 유래 줄기세포 혼탁액과 적색 형광 단백질 혼탁액을 각각 1ml 주사기에 담았으며, 각각의 주사기는 실리콘 투브를 통해 세포 로딩 채널과 물질 로딩 채널의 입구에 연결하였고, 주사기 조작을 통해 채널 내부로 주입 조작하였다.
- [0071] 세포 및 물질 로딩 채널의 반대쪽 입구에는 PBS로 채워진 1ml 주사기를 실리콘 투브를 통해 동일하게 연결하여, 물질 주입 구조물로 세포를 선택적으로 집어넣을 수 있도록 구성하였다.
- [0072] 세포 로딩 채널 양단에 연결된 세포현탁액과 PBS가 들어있는 1ml 주사기를 조작하여, 목표 세포를 물질 주입 구조물 내부로 밀어 넣은 후, 물질 주입 나노 통로와 만나는 중앙에 위치시켰다.
- [0073] 이 후, 물질 로딩 채널 양단에 설치한 전극 인가장치에 전압을 걸어주어, 물질 주입 통로를 따라서 전위차가 1.45V가 형성되도록 하고, 3초간 전압을 걸어 주었다. 오실로스코프(VDS3102, Owon)를 이용하여 전압을 측정하였다. 형광현미경(TE2000-U, Nikon)을 통해 세포의 위치를 파악하고, 적색형광 단백질 주입 과정을 촬영하여 도 8에 나타내었다.

[0074] 실시예 4

본 발명의 방법에 따라 인간 태반유래 중간엽 줄기세포에 적색 형광 단백질을 주입하는 과정

- [0076] 적색 형광 단백질(dsRed fluorescence protein, MBS5303720)를 1mg/ml 농도로 희석 (용매: PBS, Hyclone, SH30028.02, pH 7.4)하여 혼탁액을 준비하였다. 인간 태반유래 중간엽 줄기세포는 분당 차병원으로부터 분양 받

아 구축된 세포 주를 사용하였다. 배양 배지는 MEM-alpha (Gibco), 10% FBS (Hyclone), 25 ng/ml FGF-4 (Peprotech), 1ug/ml Heparin (Sigma)를 사용하였고, humidified 5% CO₂, 37°C incubator에서 계대 배양하였다.

[0077] T-flask에서 배양된 세포를 TrypLE (gibco)를 이용하여 분리하였다. 1mM EDTA in D-PBS (gibco) solution으로 교체하였다. Debris 제거를 위해 40 μm cell strainer (BD)를 이용하여 필터를 한 후 Calcein-AM으로 37°C incubator에서 15분 동안 염색하였다. 1mM EDTA in D-PBS로 교체한 후 혈구측정기 (hemocytometer)를 이용하여 2×10^6 cells/ml 농도로 인간 태반유래 중간엽 줄기세포 혼탁액을 준비하였다.

[0078] 인간 태반유래 줄기세포 혼탁액과 적색 형광 단백질 혼탁액을 각각 1ml 주사기에 담았으며, 각각의 주사기는 실리콘 투브를 통해 세포 로딩 채널과 물질 로딩 채널의 입구에 연결하였고, 주사기 조작을 통해 채널 내부로 주입 조작하였다.

[0079] 세포 및 물질 로딩 채널의 반대쪽 입구에는 PBS로 채워진 1ml 주사기를 실리콘 투브를 통해 동일하게 연결하여, 물질 주입 구조물로 세포를 선택적으로 집어넣을 수 있도록 구성하였다.

[0080] 세포 로딩 채널 양단에 연결된 세포혼탁액과 PBS가 들어있는 1ml 주사기를 조작하여, 목표 세포를 물질 주입 구조물 내부로 밀어 넣은 후, 물질 주입 나노 통로와 만나는 중앙에 위치시켰다.

[0081] 이 후, 물질 로딩 채널 양단에 설치한 전극 인가장치에 전압을 걸어주어, 물질 주입 통로를 따라서 0.87V가 형성되도록 하여 5초간 전압을 걸어 주었다. 오실로스코프(VDS3102, Owon)를 이용하여 전압을 측정하였다. 형광현미경 (TE2000-U, Nikon)을 통해 세포의 위치를 파악하고, 적색 형광 단백질 주입 과정을 촬영하여 도 9에 나타내었다.

0082] 실시예 5

본 발명의 방법에 따라 인간 폐포 기저 상피세포에 플라스미드 DNA(cy3)를 주입하는 과정

[0084] 플라스미드 DNA(MIR7904, Mirus)가 10μg/20μl 농도로 함유된 용액을 준비하였다. 인간 폐포 기저 상피세포 (A549, ATCC CCL-185, human alveolar basal epithelial cells)를 10% FBS DMEM (high glucose)를 사용하여 incubator에서 계대 배양 (humidified 5% CO₂, 37°C) 하였다.

[0085] T-flask에서 배양된 세포를 TrypLE (gibco)를 이용하여 분리하였다. 1mM EDTA in D-PBS (gibco) solution으로 교체하였다. Debris 제거를 위해 40 μm cell strainer (BD)를 이용하여 필터를 한 후 Calcein-AM으로 37°C incubator에서 15분 동안 염색하였다. 1mM EDTA in D-PBS로 교체한 후 혈구측정기 (hemocytometer)를 이용하여 2×10^6 cells/ml 농도로 인간 폐포 기저 상피 세포 A549의 혼탁액을 준비하였다.

[0086] A549 세포혼탁액과 적색 형광 단백질 혼탁액을 각각 1ml 주사기에 담았으며, 각각의 주사기는 실리콘 투브를 통해 세포 로딩 채널과 물질 로딩 채널의 입구에 연결하였고, 주사기 조작을 통해 채널 내부로 주입 조작하였다.

[0087] 세포 및 물질 로딩 채널의 반대쪽 입구에는 PBS로 채워진 1ml 주사기를 실리콘 투브를 통해 동일하게 연결하여, 물질 주입 구조물로 세포를 선택적으로 집어넣을 수 있도록 구성하였다.

[0088] 세포 로딩 채널 양단에 연결된 세포혼탁액과 PBS가 들어있는 1ml 주사기를 조작하여, 목표 세포를 물질 주입 구조물 내부로 밀어 넣은 후, 물질 주입 나노 통로와 만나는 중앙에 위치시켰다.

[0089] 이 후, 물질 로딩 채널 양단에 설치한 전극 인가장치에 전압을 걸어주어, 물질 주입 통로를 따라서 1V가 형성되도록 하고, 2초간 전압을 걸어 주었다. 오실로스코프(VDS3102, Owon)를 이용하여 전압을 측정하였다.

[0090] Plasmid DNA 주입 후, 세포를 회수하여 96 Well Plate에 주입하고 200 ul에 해당되는 배양 배지를 첨가해 주었다. 배지 첨가 후 humidified 5% CO₂, 37°C incubator에서 12시간 배양하였다. 이후 형광현미경 (TE2000-U, Nikon)을 통해 붉은 색 형광반응을 확인하였고, 이를 통해 plasmid DNA가 발현되었음을 확인하였다(도 10).

[0091] 도 1에, 하나의 물질 주입 통로(제2통로)를 갖는 세포 내부로의 물질 주입 장치(도1a)와 6개의 제2통로를 포함하는(도1b), 세포에 물질을 하는 주입하기 위한 본 발명에 사용된 장치를 나타내었다.

- [0092] 도 1a를 보면, 물질을 주입하고자 하는 세포(8)가 물질 주입 통로인 제1통로(4)를 통해 이동한다. 외부 전원(20)에 의해 물질(2)을 주입하는 통로(제2통로)(2a)와 제1통로(4) 사이에 전위차가 발생하고, 상기 세포(8)가 제1통로의 중간의 좁아진 부분을 통과할 때에 상기 세포에 걸리는 전위차에 의해 제2통로(2a)의 물질(2)가 상기 세포(8)에 주입된다. 이렇게 물질이 주입된 세포(11)는 제1통로의 배출구(5)를 통해 회수된다.
- [0093] 도 1b에는 6개의 제2통로가 형성된 본 발명에 사용된 물질 주입 장치를 나타내었다. 도 1b에 나타낸 본 발명의 장치를 이용하면, 6가지의 물질을 한 번에 세포에 주입할 수 있다.
- [0094] 도 1a 및 도 1b에서 제2통로들과 제1통로 사이에 걸리는 각각의 전위차를 조절함으로써 주입하려는 각 물질의 양을 제어할 수 있다.
- [0095] 도 2는 2개의 제2통로를 갖춘 본 발명의 방법에 사용된 물질 주입 장치에 대한 평면 투시도이다. 도 2에, 세포를 포함하는 용액의 유입 및 유출 통로(4), 상기 세포에 주입할 물질의 유입 및 유출 통로들(6, 7), 물질이 주입된 세포를 회수하는 통로(5), 상기 세포를 포함하는 용액의 유입 및 유출 통로(4)와 상기 물질이 주입된 세포를 회수하는 통로(5) 각각과 양 말단이 연결되어 있고 중간 부분이 좁은 제1통로(1) 그리고 상기 제1통로(1)의 중간 부분에서 상기 제1통로에 연결된 두 개의 제2 통로(2,3)를 나타내었다.
- [0096] 세포 하나가 제1통로(1) 중간의 좁아진 부분을 통과할 때, 상기 제1통로의 내벽과 밀착된다. 이러한 세포와 제1통로(1)의 내벽과의 밀착에 의해 제1통로(1)와 제2통로(2,3)들 사이의 전위차가 약해지는 것이 최소화된다. 제1통로 중앙 부분을 지나면 다시 넓어지면서 물질이 주입된 세포가 배출된다.
- [0097] 제2통로(2,3)의 말단은 세포에 물질을 주입하는 주사 바늘과 유사한 역할을 한다. 즉, 외부 전원에 의해 제2통로(2,3)에 집중되는 전하는 제2통로(2,3)와 인접하는 세포의 세포막(또는 세포벽)을 친공하는 기능을 하면서 동시에 물질을 상기 친공을 통해 세포 내부로 주입시킨다.
- [0098] 세포를 포함하는 용액의 유입 및 유출 통로(4)에 압력 차(예를 들면, 펌프를 사용)나 전위차(외부 전위차 발생 장치, 예를 들면, 직류 전원 또는 교류 전원 사용)를 걸어 주면, 세포가 제1통로(1)로 유입된다. 제1통로(1)를 통과하면서 물질 주입이 이루어진 세포는 통로(5)를 통해 배출된다. 물질 유입 및 유출(6,7) 통로에는 세포 내부로 주입 할 물질이 이동한다.
- [0099] 도 3은 도 2에 나타낸 제1통로(1)와 제2통로들(2,3)을 3차원으로 묘사한 그림이다. 도 3b에 나타낸 바와 같이, 제2통로들(2,3)은 제1통로(1)와 연결되어 있다.
- [0100] 도 4는 단일 세포에 2가지 물질을 동시에 주입하는 과정을 도시한다. 제1통로의 한쪽 입구로 유입된 세포(8)는 제1통로 중간의 좁아진 부분(9)에서 제2통로들(10)을 통해 2가지 물질을 주입 받은 후에 제1통로의 반대쪽 유출구(11)를 통해 회수된다.
- [0101] 도 5는 본 발명의 방법에 사용되는 세포에 물질을 주입하는 장치에 대한 20배 현미경 사진이다. (외부의 전위차 인가 장치는 나타나 있지 아니함).
- [0102] 도 5의 좌측 사진은 세포를 포함하는 용액의 유입 및 유출 통로(5), 상기 세포 내부로 주입할 물질의 유입 및 유출 통로들(6, 7), 및 물질이 주입된 세포를 회수하는 배출 통로(4)가 형성된 사진이다.
- [0103] 도 5의 우측 사진은, 상기 도 5의 좌측 사진에 나타난, 세포를 포함하는 용액의 유입 및 유출 통로(5)와 상기 물질이 주입된 세포를 회수하는 통로(4) 각각과 양 말단에서 연결되어 있으면서 중간 부분이 좁은 형태인 제1통로(1), 그리고 상기 제1통로의 중간 부분에서 상기 제1통로에 연결되면서 물질 유입 유출 통로(6,7)와 각각 연결된 두 개의 제2통로(2,3)가 형성되어 있는 본 발명에 사용된 장치의 20배 확대 사진이다.
- [0104] 도 6은 유리상 고체 내부에 형성된 본 발명의 방법에 사용된 물질 주입 장치의 외관 사진이다.
- [0105] 도 7은 본 발명의 방법으로, 인간 폐포 기저 상피 세포 (A549, ATCC CCL-185)에 적색 형광 단백질(red fluorescence protein, RFP)를 주입하는 과정을 촬영한 사진들이다. A549 세포를 칼세인 AM(Calcein AM)으로 처리하여 녹색 형광을 발생시키는 경우 단백질이 주입된 세포가 살아 있다고 평가하였다.
- [0106] 도 7a는 살아 있는(녹색 형광) A549 세포가 제1통로 중앙에 위치한 것을 보여주고, 도 7b는 제2통로와 제1통로 사이에 전위차를 가했을 때 RFP가 제2통로를 통해 이동하여 상기 A549 세포 내부로 주입이 시작된 모습(적색 형광)을 보여주며, 도 7c는 A549 세포 내부로 RFP가 주입되고 있음을 분명히 보여주고(적색 형광), 도 7d는 RFP의 주입 후에도 A549 세포가 살아 있음을 보여주며(녹색 형광), 도 7e 및 7f는 위 과정을 2회 반복한 경우에도

A549 세포 내부로 RFP가 성공적으로 주입되었음을 보여준다.

[0107] 도 8은 본 발명의 방법으로 인간 제대혈 줄기세포 내부로 RFP를 주입한 과정을 촬영한 사진이다. 칼세인 AM을 사용하여 세포의 생존여부를 확인하였다.

[0108] 도 8a는 녹색 형광(14)을 통해 제1통로의 중앙에 위치한 인간 제대혈 줄기세포가 살아 있음을 보여주고, 도 8b는 적색 형광(15)을 통해 RFP가 제2통로에 채워져 있고 녹색 형광을 통해 인간 제대혈 줄기세포에 RFP 주입 준비가 잘 되어있음을 보여주며, 도 8c는 제2통로의 말단 부분에 더 밝은 적색 형광(16)을 통해 RFP의 주입을 위해 전기장을 걸어준 후 RFP의 주입이 시작되었음을 보여주고, 도 8d는 적색 형광(17)을 통해 인간 제대 줄기세포 내부로 RFP가 주입되었음을 보여주며, 도 8e는 적색 형광(18)을 통해 인간 제대혈 줄기세포가 제1통로의 배출구 쪽으로 이동하고 있음을 보여주고, 도 8f는 적색 형광(19)을 통해 인간 제대혈 줄기세포가 제1통로로부터 완전히 배출되었음을 보여준다.

[0109] 도 9는 본 발명의 방법으로 인간 태반 유래 중간엽 줄기세포에 적색 형광 단백질을 주입하는 과정을 촬영한 사진이다.

[0110] 도 10은 본 방법의 방법으로 인간 폐포 기저상피세포(ATCC CCL-185)에 플라스미드 DNA(cy3)를 주입하여 12시간 배양한 이후에 촬영한 사진이다.

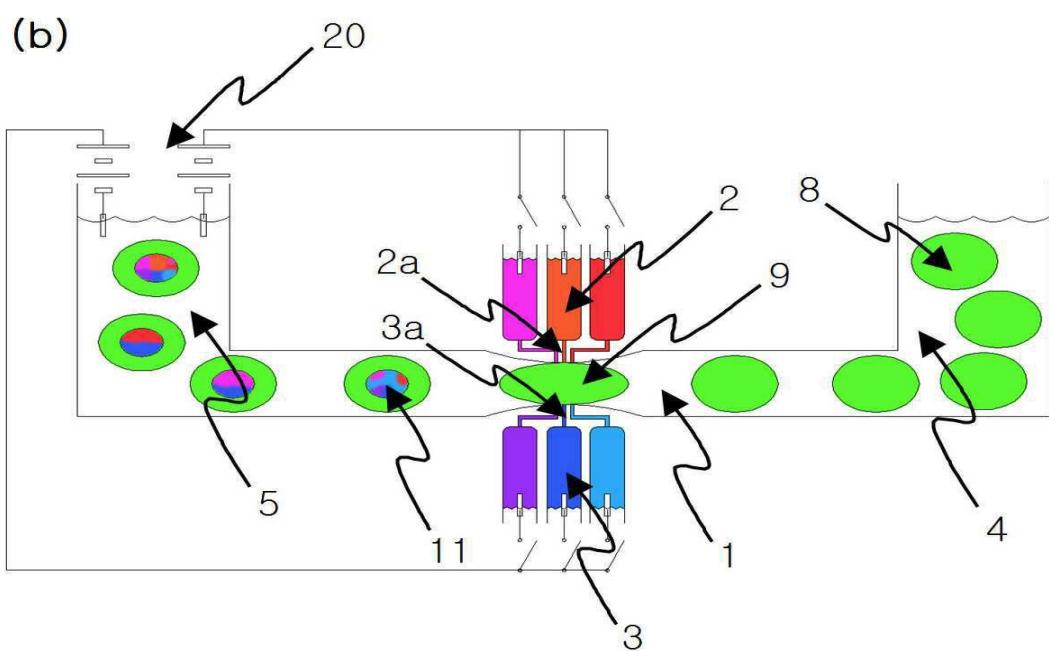
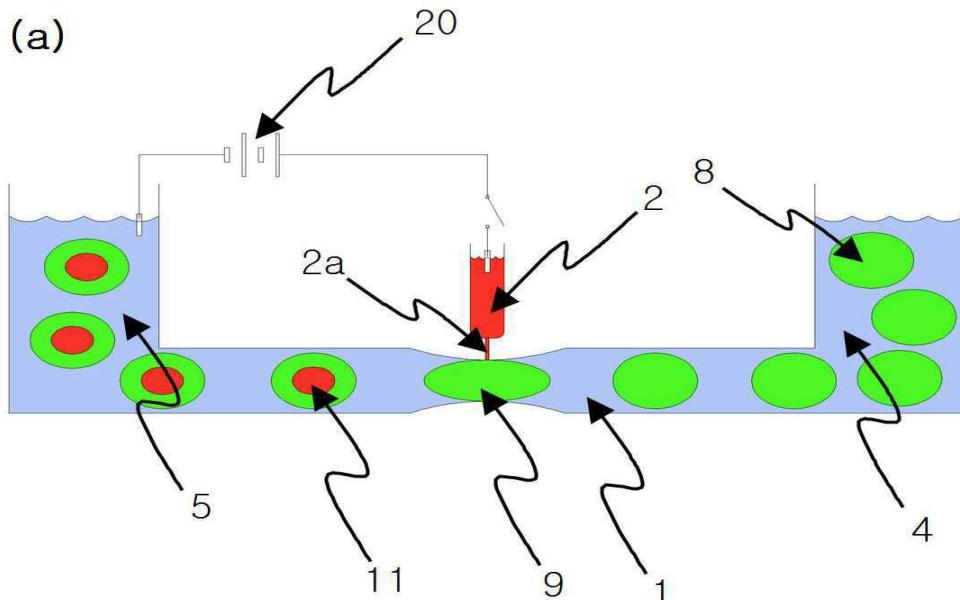
[0111] 도 11은 본 발명의 방법에 사용된 유리 내부(23)에 형성된 장치를 제작하는데 사용된 펌토초 레이저 가공 장치의 분해사시도이다.

[0112] 이상과 같이, 실시예 1 내지 5와 도 1 내지 11을 통하여 본 발명의 방법을 설명하였지만, 이들은 오로지 설명을 하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 그들만으로 한정하고자 하는 것은 아니다.

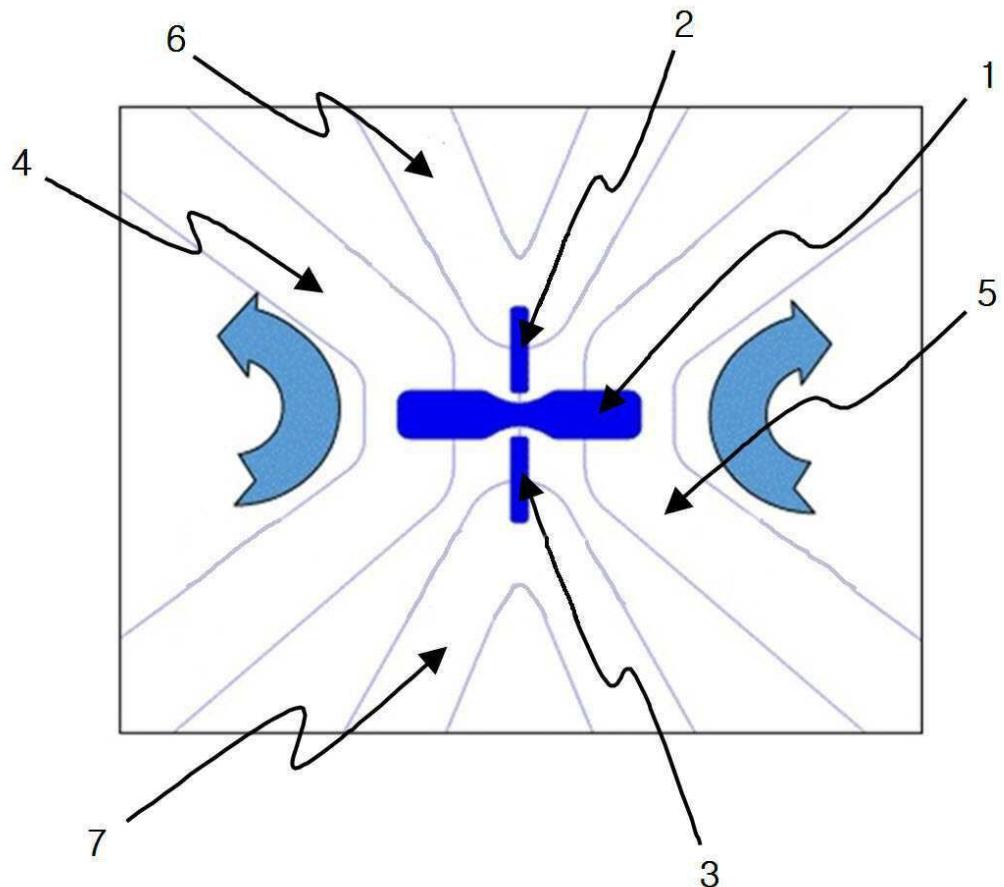
[0113] 다음의 특허청구범위에 나타낸 본 발명의 권리범위를 벗어나지 아니하고도, 수 많은 변형과 기술적 특징의 조합이 가능하다는 사실을 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 쉽게 알 수 있을 것이다. 그러나 그러한 변형들은 본 발명의 요지나 범위를 벗어나는 것으로 간주될 수 없으며 그러한 모든 변형들은 다음의 청구항들의 권리 범위에 포함되기를 의도하는 것이다.

도면

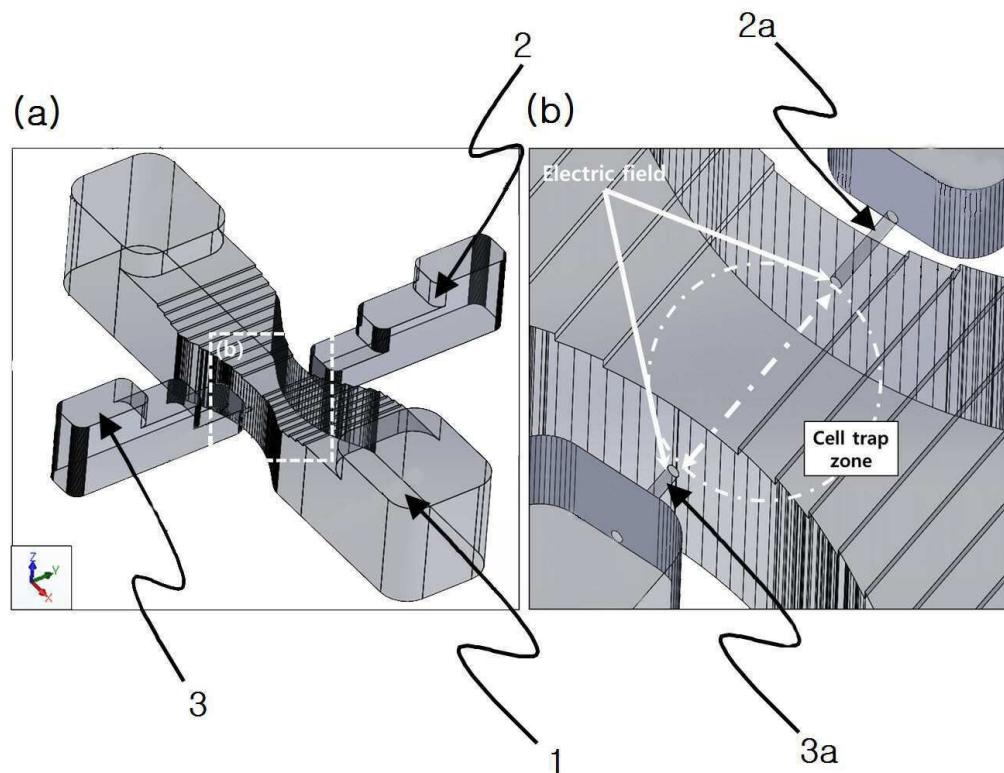
도면1



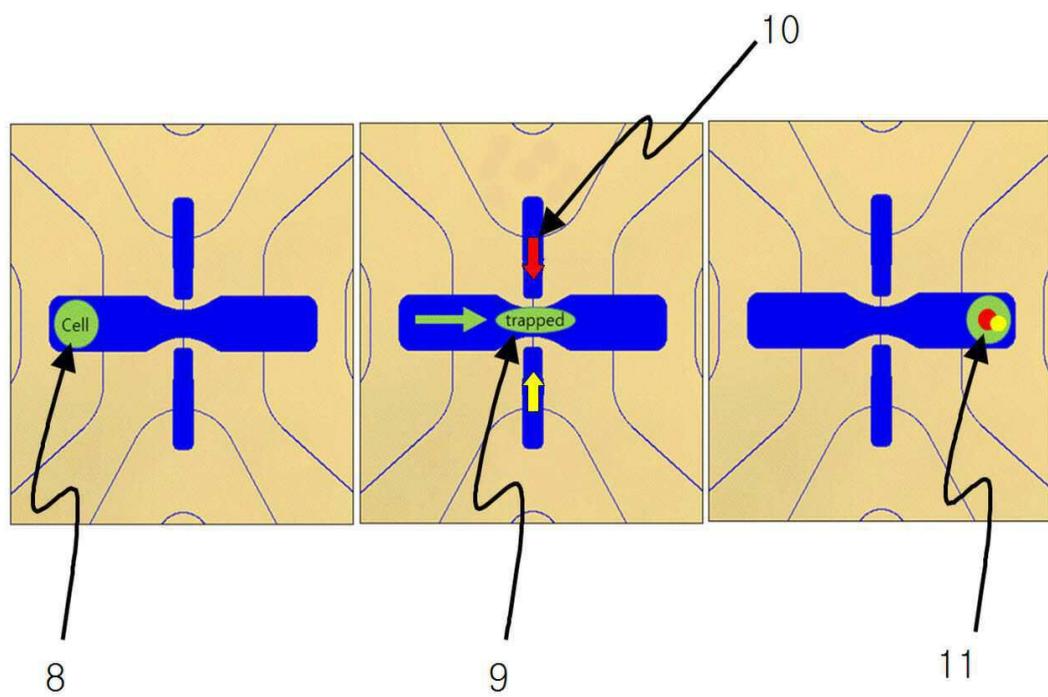
도면2



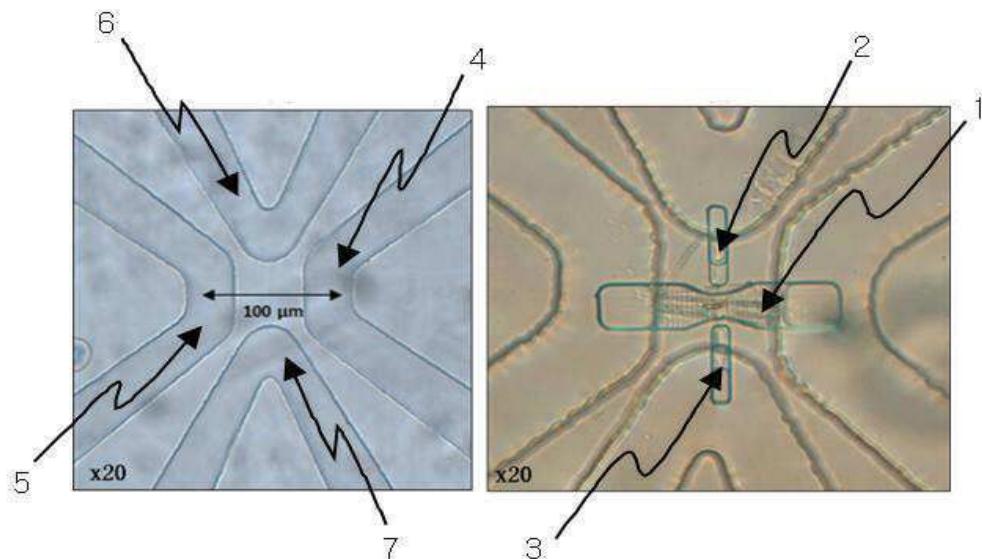
도면3



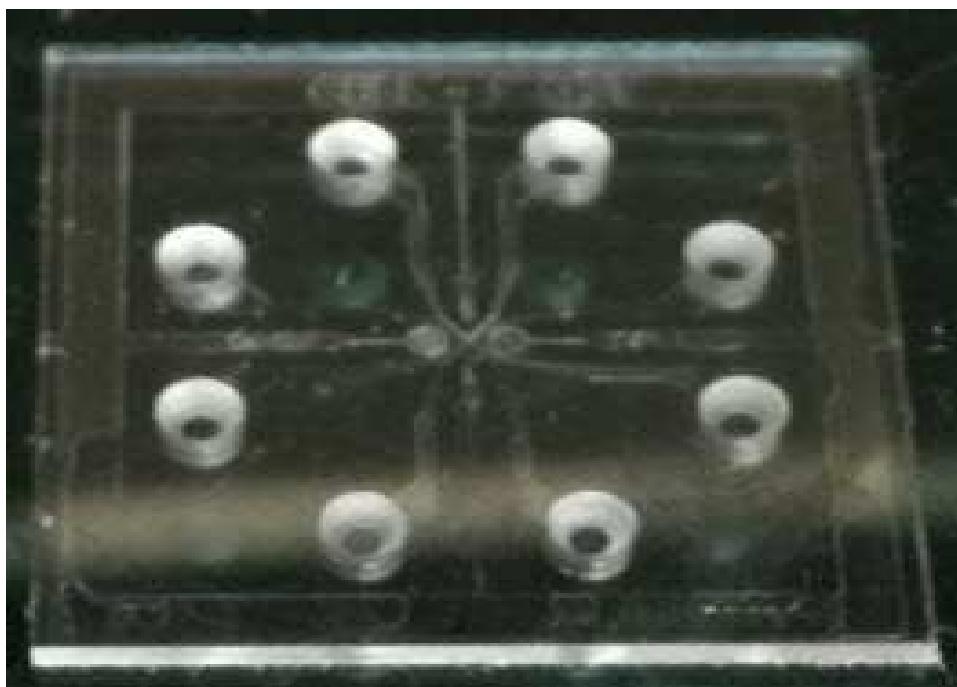
도면4



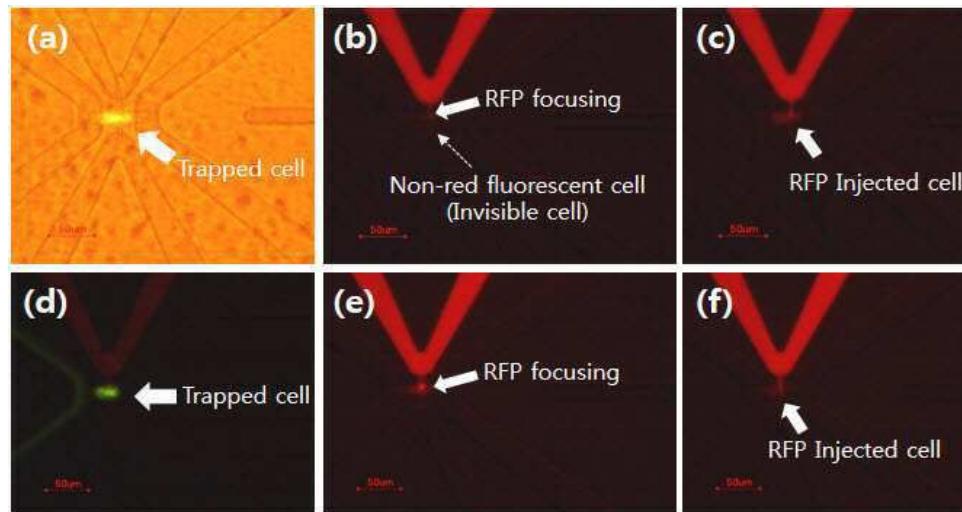
도면5



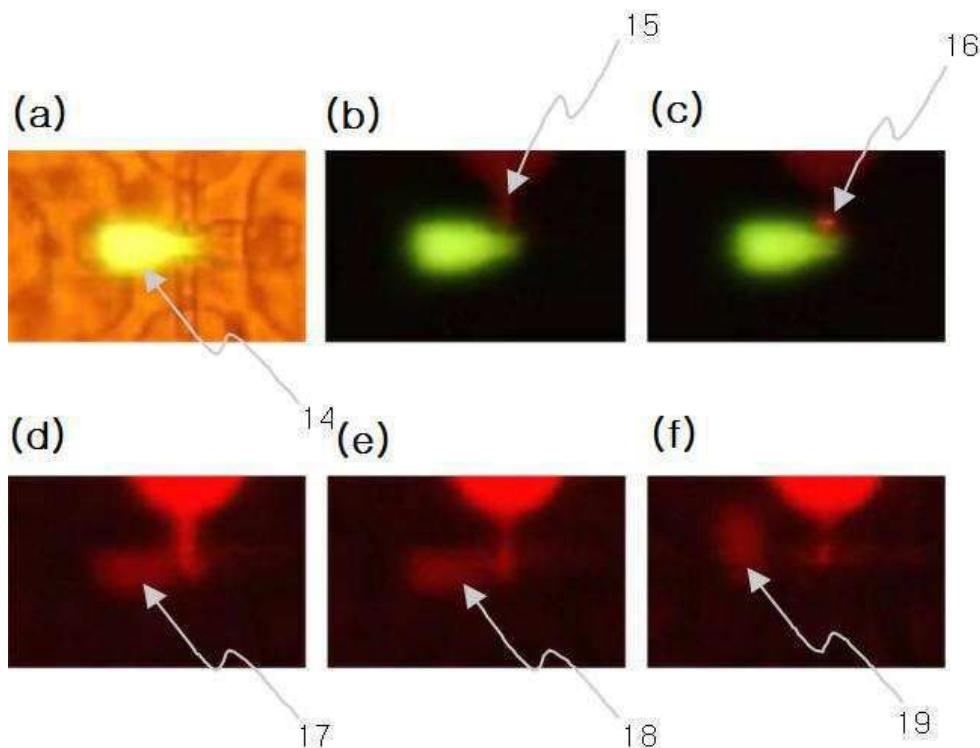
도면6



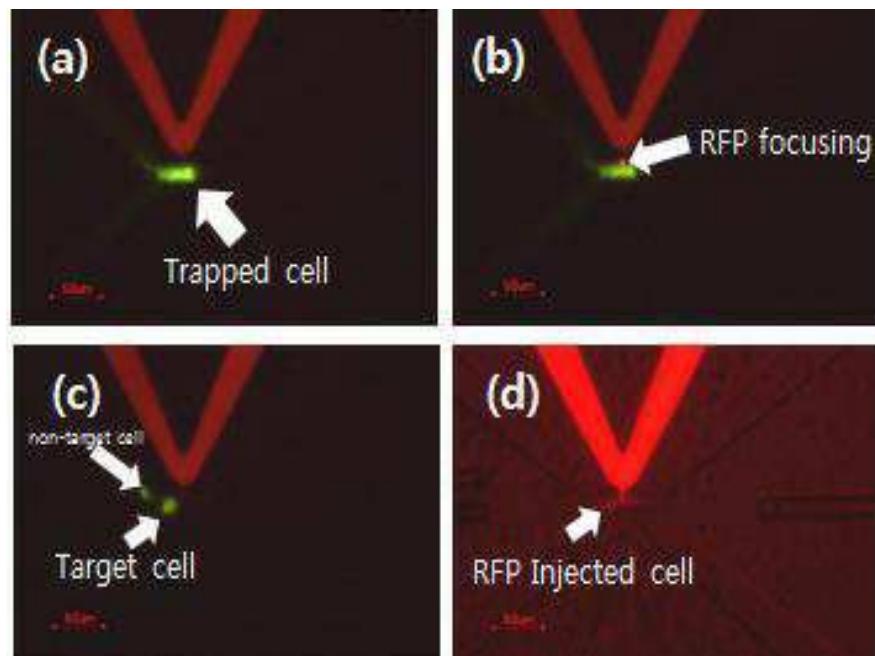
도면7



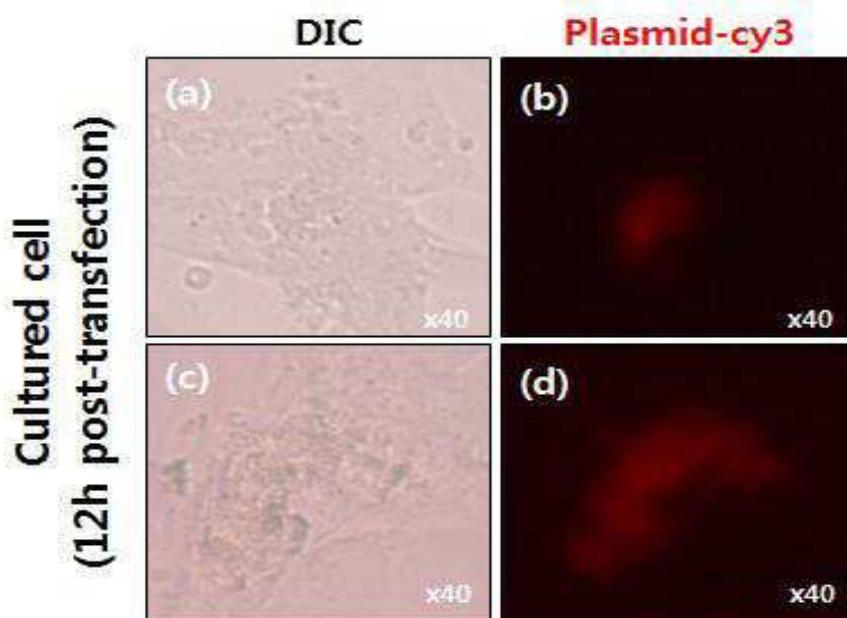
도면8



도면9



도면10



도면11

