



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0135558
(43) 공개일자 2011년12월19일

(51) Int. Cl.

C12M 3/02 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 11/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0055354

(22) 출원일자 2010년06월11일

심사청구일자 2010년06월11일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

박성수

서울특별시 영등포구 여의도동 수정아파트 A동 1305호

김소현

경기도 고양시 덕양구 토당동 동아빌라 C동 102호

남성원

서울특별시 영등포구 여의도동 한양아파트 D동 204호

(74) 대리인

노준태, 박국진, 이준호, 장영태

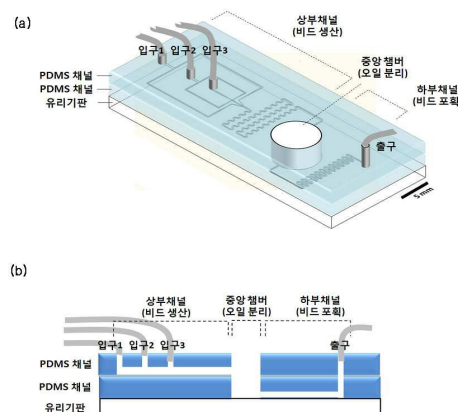
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 알지네이트 비드의 연속적인 생산 및 포획이 가능한 미세 관류 배양 시스템

(57) 요약

본 발명은 알지네이트 비드의 연속적인 생산 및 포획이 가능한 미세 관류 배양 시스템에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액을 각각 유입시키기 위한 유체 주입부; 상기 유체 주입부로 유입된 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액을 상호 반응시켜 알지네이트 비드를 형성시키기 위한 제1채널부; 상기 제1채널부에서 형성된 알지네이트 비드와 오일을 분리하기 위한 챔버부; 및 상기 챔버부에서 분리된 알지네이트 비드를 포획하기 위한 제2채널부를 포함함으로써 알지네이트 비드 내 단일 및 다중 세포 포집, 오일 제거, 알지네이트 단일 비드 포획 및 세포 배양을 하나의 소자 내에서 연속적으로 구현할 수 있을 뿐만 아니라 세포의 생존에 유익하지 못한 오일 성분을 신속히 회석 및 제거시킬 수 있어 세포의 생존율을 현저히 높일 수 있는 미세 관류 배양 시스템에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345076521
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국과학재단
연구사업명	우수연구센터지원사업
연구과제명	나노구조를 이용한 바이오센서 연구(5-3)
기여율	1/2
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2008.03.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	10816
부처명	서울특별시
연구관리전문기관	서울산업통상진흥원(서울시정개발연구원)
연구사업명	서울시 산학연 협력사업(2006년 기술기반구축사업)
연구과제명	나노 기술을 이용한 바이오 융합산업 혁신 클러스터
기여율	1/2
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2006.08.01 ~ 2011.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액을 각각 유입시키기 위한 유체 주입부;

상기 유체 주입부로 유입된 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액을 상호 반응시켜 알지네이트 비드를 형성시키기 위한 제1채널부;

상기 제1채널부에서 형성된 알지네이트 비드와 오일을 분리하기 위한 챔버부; 및

상기 챔버부에서 분리된 알지네이트 비드를 포획하기 위한 제2채널부를 포함하는 미세 관류 배양 시스템.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 제1채널부는 중성 오일과 알지네이트 용액을 반응시켜 알지네이트 방울을 형성한 후 상기 알지네이트 방울과 칼슘화된 오일을 반응시켜 알지네이트 비드를 형성하도록 구성된 것인 미세 관류 배양 시스템.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 제1채널부는 알지네이트 방울과 칼슘화된 오일이 충분히 반응할 수 있도록 꼬불꼬불한 구조의 채널 말단부를 갖는 것인 미세 관류 배양 시스템.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 챔버부는 알지네이트 비드와 오일의 밀도 차이에 의해 양자를 분리하는 것인 미세 관류 배양 시스템.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 알지네이트 용액은 배양될 세포가 포함된 것인 미세 관류 배양 시스템.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 챔버부는 칼슘화된 오일의 세포 독성을 희석시키기 위한 중성 오일이 미리 주입되어 있는 것인 미세 관류 배양 시스템.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 제2채널부의 말단에는 제2채널부에 음압을 걸어줄 수 있는 주사기가 연결되어 있는 미세 관류 배양 시스템.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 제1채널부 및 제2채널부는 PDMS로 형성된 것인 미세 관류 배양 시스템.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 미세 관류 배양 시스템 내에서 알지네이트 비드 내 세포 포집, 오일의 제거, 알지네이트 비드의 포획 및 세포 배양이 연속적으로 이루어지는 3차원 세포 배양 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알지네이트 비드의 연속적인 생산 및 포획과 오일 제거가 가능한 미세 관류 배양 시스템과 이 시스템을 이용하여 알지네이트 비드 내에서 세포를 연속적으로 배양하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미세 유체 소자는 칩 내에 형성되어 있는 미세채널로 미량의 분석 대상 물질을 흘려보내면서 그 안에 존재하는 각종 물질을 분석할 수 있는 칩을 의미한다. 이는 랩온어칩(lab-on-a chip, LOC: 칩 위의 실험실)이라고도 불리는데, 작은 칩 내에서 분석 대상 물질을 한 번에 분석할 수 있기 때문이다. 미세 유체 소자는 물질의 분석, 분리 및 합성 등에 있어 소모되는 시약의 양이 적고 분석 시간을 짧아 점차 그 사용 분야가 확대되고 있다.

[0003] 하이드로겔은 다량의 수분과 유전자, 펩타이드, 단백질 및 세포 등을 쉽게 함유할 수 있는 3차원 입체 구조를 지닌 친수성 고분자이다. 하이드로겔은 높은 범위의 수축 팽창력, 높은 확산도 등의 특이한 성질로 인하여 콘택트 렌즈, 인공장기, 약물전달, 미용 및 생물학적 센서 등에 이용되어 왔다. 특히, 구형의 하이드로겔 비드는 고유의 생체친화성 및 친수성 성질로 인해 바이오센서, 조영제, 약물전달기구, 세포전달체, 및 세포 혹은 조직의 이식에 매우 활용가치가 높은 재료로 알려져 있다. 이 중에서 알지네이트 비드는 자연으로부터 얻어진 다량류로 구성되어 있어 독성이 없고 생분해능력이 탁월하며 합성 방법이 매우 간편하고 빨라서 DNA, 단백질, 효소, 항체, 세포 등의 캡슐화에 사용되고 있다.

[0004] 알지네이트 비드의 제조방법으로는 이멀전화, 내부가교법, 스프레이법 등이 알려져 있는데, 종래의 방법들은 알지네이트 비드를 생성시킨 후 칩 내에서 오일을 분리하는 것이 불가능하였기 때문에 알지네이트 비드의 연속적인 생산 및 포획이 어려웠고 수득된 알지네이트 비드를 칩 외부로 꺼내어 별도의 오일 제거 공정을 수행하여야 하는 불편함이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 칩 내에서 알지네이트 비드의 연속적인 생산 및 포획과 오일 제거가 가능한 미세 관류 배양 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 또한, 본 발명은 위와 같은 미세 관류 배양 시스템을 이용하여 간단하고 신속하게 세포를 배양하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액을 각각 유입시키기 위한 유체 주입부; 상기 유체 주입부로 유입된 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액을 상호 반응시켜 알지네이트 비드를 형성시키기 위한 제1채널부; 상기 제1채널부에서 형성된 알지네이트 비드와 오일을 분리하기 위한 챔버부; 및 상기 챔버부에서 분리된 알지네이트 비드를 포획하기 위한 제2채널부를 포함하는 미세 관류 배양 시스템을 제공한다.

[0008] 본 발명은 상기 미세 관류 배양 시스템 내에서 알지네이트 비드 내 세포 포집, 오일의 제거, 알지네이트 비드의 포획 및 세포 배양이 연속적으로 이루어지는 3차원 세포 배양 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0009] 본 발명의 미세 관류 배양 시스템은 오일 이멀전 기법을 통해 알지네이트 비드 혹은 세포가 포집된 알지네이트 비드를 생산한 후, 추후 실험에 불필요한 오일을 제거하기 위한 분리된 공정을 필요로 하지 않고 미세 관류 배양 시스템 내에서 연속적으로 알지네이트 비드 생산과 오일 제거가 가능하다. 이에 따라 신속하고 간단하게 관련 실험을 설계할 수 있다.
- [0010] 본 발명의 미세 관류 배양 시스템은 알지네이트 비드 내 단일 및 다중 세포 포집, 오일 제거, 알지네이트 단일 비드 포획 및 세포 배양이 하나의 소자 내에서 연속적으로 구현되는 3차원 세포 배양 칩으로 활용될 수 있다.
- [0011] 본 발명의 미세 관류 배양 시스템은 알지네이트 비드 내 세포 포집 후 세포의 호흡 및 대사 등에 유익하지 못한 오일 성분을 빠르게 희석 및 제거시키고 알지네이트 비드를 수용액 상에 위치하도록 할 수 있으므로 세포의 생존율을 현저히 높일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 미세 관류 배양 시스템을 이용한 세포 배양 방법은 알지네이트 비드 내 3차원 세포 배양 및 녹농균 등의 세균 배양을 원-스탑으로 구현할 수 있어 세포 분화 연구, 항생제 테스트 등에 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 본 발명에 따른 미세 관류 배양 시스템의 일례를 나타내는 도면이다.
- 도 2는 알지네이트 비드가 본 발명에 따른 미세 관류 배양 시스템의 제1채널부에서 생산되는 것(도 2a)과 생산된 알지네이트 비드가 제2채널부에 포획되는 것(도 2b)을 나타내는 사진이다.
- 도 3은 알지네이트 비드 내에 연골 세포를 포집시킨 후 본 발명에 따른 미세 관류 배양 시스템의 챔버부 하부에 침강한 알지네이트 비드 내 세포의 생존(도 3a)과 상기 알지네이트 비드를 제2채널부에 포획시켜 하루 동안 배양시킨 후에 세포의 생존(도 3b)을 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액을 각각 유입시키기 위한 유체 주입부; 상기 유체 주입부로 유입된 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액을 상호 반응시켜 알지네이트 비드를 형성시키기 위한 제1채널부; 상기 제1채널부에서 형성된 알지네이트 비드와 오일을 분리하기 위한 챔버부; 및 상기 챔버부에서 분리된 알지네이트 비드를 포획하기 위한 제2채널부를 포함함으로써 알지네이트 비드 내 단일 및 다중 세포 포집, 오일 제거, 알지네이트 단일 비드 포획 및 세포 배양을 하나의 소자 내에서 연속적으로 구현할 수 있을 뿐만 아니라 세포의 생존에 유익하지 못한 오일 성분을 신속히 희석 및 제거시킬 수 있어 세포의 생존율을 현저히 높일 수 있는 미세 관류 배양 시스템에 관한 것이다.
- [0015] 이하 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.
- [0016] 본 발명의 미세 관류 배양 시스템은 유체 주입부, 제1채널부, 챔버부 및 제2채널부를 포함한다.
- [0017] 유체 주입부는 알지네이트 비드 또는 배양될 세포가 포집된 알지네이트 비드를 생산하는데 필요한 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액(배양될 세포를 포함할 수 있음)을 제1채널부로 유입시키기 위한 것이다. 유체 주입부는 위와 같은 역할을 수행할 수 있다면 특정 구조의 것으로 한정되지 않으며, 예컨대 도 1에서는 입구 1(칼슘화된 오일), 입구 2(중성 오일) 및 입구 3(알지네이트 용액)이 유체 주입부에 해당된다. 다만, 수용성인 알지네이트 용액이 유입되는 곳과 다른 오일류가 유입되는 곳은 구분되는 것이 바람직하다.
- [0018] 제1채널부는 유체 주입부로 유입된 칼슘화된 오일, 중성 오일 및 알지네이트 용액이 상호 반응시키는 역할을 수행한다. 오일 이멀전 방식에 따라 알지네이트 비드를 형성하기 위해서는 알지네이트 방울과 가교제인 칼슘이 반응할 수 있도록 해야 하기 때문에, 도 1에 도시된 것처럼 먼저 중성 오일과 알지네이트 용액을 반응시켜(입구 2에 연결된 채널과 입구 3에 연결된 채널이 만나는 지점) 알지네이트 방울을 형성한 후 알지네이트 방울과 칼슘화된 오일을 반응시켜(알지네이트 방울이 유입되는 채널과 입구 1에 연결된 채널이 만나는 지점) 알지네이트 비드를 형성하도록 하는 구성을 갖는 것이 바람직하다.
- [0019] 또한, 알지네이트 방울과 칼슘화된 오일이 충분히 반응할 수 있도록 제1채널부 중 알지네이트 방울과 칼슘화된 오일을 반응하는 채널(도 1에서는 입구 1, 입구 2 및 입구 3과 중앙 챔버 사이의 뱀형 구조의 채널)은 꼬불꼬불하

게 형성되어 있는 것이 바람직하다. 꼬불꼬불한 구조가 두 물질의 혼합 및 반응에 유리하다.

- [0020] 챔버부는 알지네이트 비드와 오일을 분리하기 위한 구조이다. 오일 성분은 세포의 호흡 및 대사 등에 유익하지 못하기 때문에 신속히 회석 및 제거시키는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명의 챔버부는 알지네이트 비드와 오일의 밀도 차이에 의해 양자를 분리하는 구조를 가질 수 있다. 알지네이트 비드는 무게에 의해 챔버부 하부로 침강하고 저밀도의 오일은 상부에 머무르게 되므로 양자가 분리될 수 있다. 상부에 존재하는 오일은 피펫 등의 도구를 이용하여 제거할 수 있다.
- [0022] 챔버부 하부에는 칼슘화된 오일로 세포 독성을 갖는 물질이 사용되는 경우, 중성 오일을 미리 주입시켜 놓을 수 있다. 중성 오일은 칼슘화된 오일의 세포 독성을 회석 및 제거시키는 역할을 하며, 예컨대, 시그마 알드리치사의 미네랄 오일 등이 중성 오일로 사용될 수 있다.
- [0023] 제2채널부는 챔버부에서 분리된 알지네이트 비드를 포획하기 위한 구성으로서, 챔버부의 하부에 알지네이트 비드가 침강되어 있는 경우 도 1과 같이 챔버부의 하부와 연결되도록 구성하는 것이 바람직하다. 또한, 제2채널부는 알지네이트 비드의 포획에 적합하도록 곡선 구조를 갖는 것이 바람직하다.
- [0024] 제2채널부의 말단에는 제2채널부에 음압을 걸어줄 수 있는 수단(예컨대, 주사기)이 연결될 수 있다. 또한, 제2채널부 말단의 출구를 통해 세포 배양에 필요한 배지, 물 등의 수용액 등이 주입될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 미세 관류 배양 시스템은 특정 방법에 따라 제조된 것으로 한정되지 않는다. 예컨대, 다음과 같이 제작될 수 있다. 상, 하부 두 층의 채널을 각각 제작한 후, 두 층의 채널면이 모두 아래쪽을 향하도록 하고 상부층 채널 끝나는 부분에서 하부층 채널이 시작되도록 두층을 배열하여 접착시킨다(도 1b 참고). 각 입구와 출구부 중앙 챔버에 구멍을 뚫은 후, 하부층 채널면을 기저 기판면에 접촉시킨다. 구멍은 두 채널층의 접촉 전에 뚫을 수도 있다. 상부 채널은 오일 이멸전에 의해 비드가 생산될 수 있도록 소수성 표면을 가지도록 제작되며, 하부 채널은 친, 소수성과 무관하게 제작된다.
- [0026] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 본 발명의 기술사상을 보다 구체화하기 위한 것일 뿐이며 이에 의해 본 발명의 청구범위가 제한 해석되지 않는다.

[0027] 실시예

[0028] 실시예 1. 미세 관류 배양 시스템의 제조

- [0029] 다음과 같은 순서에 따라 도 1의 미세 관류 배양 시스템을 제조하였다.
- [0030] 1) 상, 하부 두 채널에 대해 각각 포토리소그래피를 통해 마스터를 제작한 후, PDMS 몰딩 기법을 이용하여 각 채널 층을 완성하였다.
- [0031] 2) 상부 PDMS층 채널 입구부에 구멍을 뚫었다.
- [0032] 3) 상부 PDMS층의 채널 면과 하부 PDMS층의 채널의 반대 면을 산소 플라즈마 처리한 후, 산소 플라즈마 처리된 두 면을 접촉시켜 두 PDMS 층을 접착시켰다(접착 시 상부 채널이 끝나는 지점에서 상부 채널이 시작되도록 배열한 후 접착시켰다).
- [0033] 4) 접착 과정 중 산소 플라즈마 처리됨으로써 유도된 상부 채널의 표면의 친수성이 다시 소수성으로 회복될 때까지 하루 이상 방치하였다.
- [0034] 5) 접착된 두층의 PDMS 채널에 중앙 챔버와 출구부에 구멍을 뚫었다.
- [0035] 6) 하부 채널면과 유리 기판에 산소 플라즈마 처리를 하여 두 면을 접착시켰다.

[0036] 실시예 2. 알지네이트 비드의 생산 및 포획

- [0037] 실시예 1의 미세 관류 배양 시스템(도 1)을 이용하여 알지네이트 비드 생산, 오일 제거 및 알지네이트 비드 포획이 하나의 소자 내에서 연속적으로 구현되는지를 다음과 같이 확인하였다.
- [0038] 도 1의 미세 관류 배양 시스템은 상부 채널(제1채널부) 및 하부 채널(제2채널부)과 이 두 채널을 연결하는 중앙

챔버(챔버부)를 포함하고 있는데, 상부 채널은 알지네이트 비드 생산, 중앙 챔버는 알지네이트 비드와 오일의 분리, 하부 채널은 비드의 포획을 담당하였다.

[0039] 먼저, 제2채널부 말단의 출구를 통해 하부 채널과 중앙 챔버의 하단부를 수용액으로 채웠다.

[0040] 그 후, 입구1에 올레산에 200 mM의 농도로 칼슘을 녹인 용액(칼슘화된 오일), 입구2에 미네랄 오일(시그마 알드리치사, 중성 오일), 입구3에 2% 알지네이트 용액을 주입하여, 입구2와 연결된 채널과 입구3과 연결된 채널이 만나는 곳에서 알지네이트 방울이 형성되고, 이 후 알지네이트 방울이 흐르는 채널과 입구1과 연결된 채널이 만나는 곳에서 알지네이트 방울과 칼슘올레산 용액이 반응하도록 하여 아래쪽 뱀형의 채널에서 섞이면서 칼슘과 알지네이트를 반응시켜 알지네이트 비드를 생산하였다(도 2a).

[0041] 생산된 알지네이트 비드는 중앙 챔버를 거치면서 그 무게에 의해 하부로 침강하였고, 미네랄 오일(저밀도 오일)은 상부에 그대로 머물게 되었다. 그 후, 하부 채널의 출구 쪽에서 시린지로 음압을 걸어 당겨주었고 알지네이트 비드가 포함된 수용액이 하부 채널 쪽으로 유입되면서 알지네이트 비드가 하부 채널에 포획되었다(도 2b). 그 후, 중앙 챔버 상부에 떠 있는 오일은 파이프렛으로 제거하였다.

[0042] 실시예 3. 미세 관류 배양 시스템을 이용한 알지네이트 비드 내 3차원 세포 배양

[0043] 도 1의 미세 관류 배양 시스템을 이용하여 알지네이트 비드 내 연골 세포 포집, 오일 제거, 연골 세포가 포함된 알지네이트 비드 포획 및 세포 배양이 하나의 소자 내에서 연속적으로 구현되는 3차원 세포 배양이 가능한지 여부를 확인하였다.

[0044] 먼저, 제2채널부 말단의 출구를 통해 하부 채널과 중앙 챔버의 하단부를 세포 배양 배지로 채우고 중앙 챔버의 상부는 미네랄 오일(시그마 알드리치사, 중성 오일)로 채워 놓았다.

[0045] 그 후, 입구1에 올레산에 200 mM의 농도로 칼슘을 녹인 용액(칼슘화된 오일), 입구2에 미네랄 오일(시그마 알드리치사, 중성 오일), 입구3에 연골 세포가 포함된 2% 알지네이트 용액을 주입하여, 입구2와 연결된 채널과 입구3과 연결된 채널이 만나는 곳에서 알지네이트 방울이 형성되고, 이 후 알지네이트 방울이 흐르는 채널과 입구1과 연결된 채널이 만나는 곳에서 알지네이트 방울과 칼슘올레산 용액이 반응하도록 하여 아래쪽 뱀형의 채널에서 섞이면서 칼슘과 알지네이트를 반응시켜 연골 세포가 포함된 알지네이트 비드를 생산하였다(도 3a).

[0046] 생산된 연골 세포가 포함된 알지네이트 비드는 중앙 챔버를 거치면서 그 무게에 의해 하부로 침강하였고, 미네랄 오일(저밀도 오일)은 상부에 그대로 머물게 되었다. 이때 상부 채널에서 흘러나오는 올레산을 포함한 용액은 중앙 챔버에 미리 주입해 놓은 미네랄 오일에 희석되어 세포 독성이 감소하였다.

[0047] 그 후, 하부 채널의 출구 쪽에서 시린지로 음압을 걸어 당겨주었고 연골 세포가 포함된 알지네이트 비드가 포함된 수용액이 하부 채널 쪽으로 유입되면서 연골 세포가 포함된 알지네이트 비드가 하부 채널에 포획되었다. 그 후, 중앙 챔버 상부에 떠 있는 오일은 파이프렛으로 제거하였다.

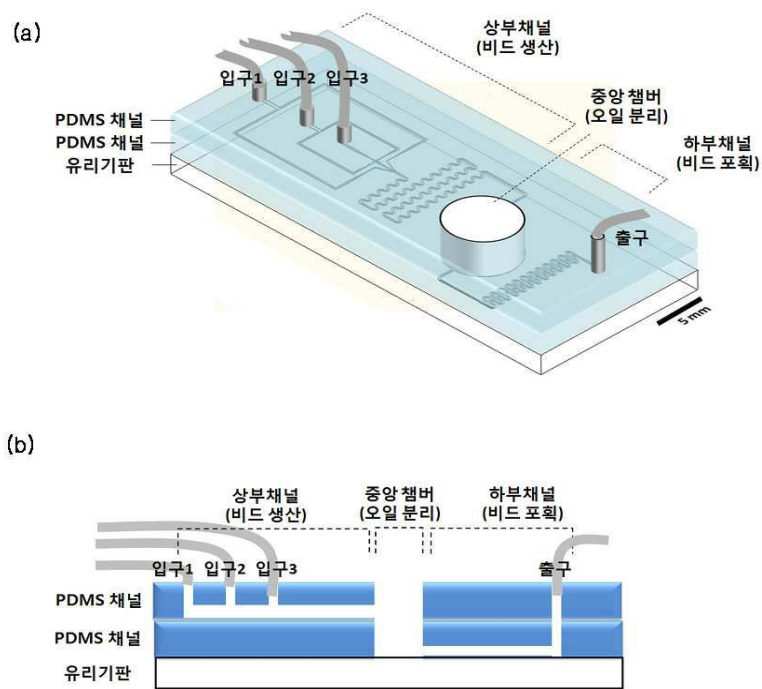
[0048] 세포 생존 여부는 포획된 알지네이트 비드 속에서 연골 세포를 하루 동안 배양한 후 calceinAM 염색을 통해 녹색 형광을 띄는지 여부에 따라 확인하였다(도 3b). 세포 생존율, 즉 알지네이트 비드에 포집된 총 세포의 수에 대한 생존한 세포의 수의 비율은 70-90%인 것으로 확인되었다. 이는 칼슘올레산을 추후에 제거하였을 경우(10-20% 미만)의 세포 생존율에 비해 크게 개선된 결과이다.

산업상 이용가능성

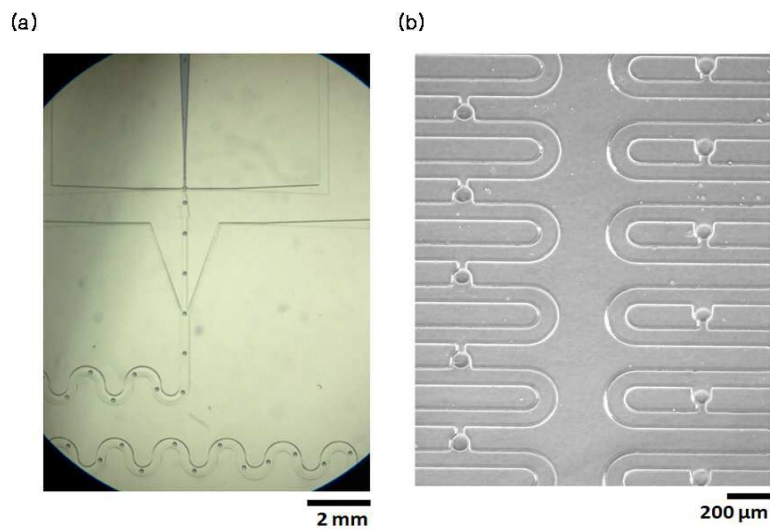
[0049] 본 발명은 3차원 세포 배양 및 녹농균 등의 세균 배양을 원-스탑으로 구현할 수 있어 세포 분화 연구, 항생제 테스트 등에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

도면1

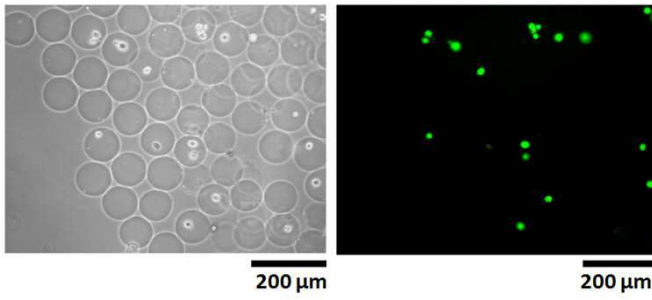


도면2



도면3

(a)



(b)

