



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월09일
(11) 등록번호 10-2064388
(24) 등록일자 2020년01월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/447 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 27/44795 (2013.01)
G01N 27/4473 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0131212
- (22) 출원일자 2017년10월11일
심사청구일자 2017년10월11일
- (65) 공개번호 10-2018-0109647
- (43) 공개일자 2018년10월08일
- (30) 우선권주장
1020170038364 2017년03월27일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020160107386 A*
(뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
- (72) 발명자
김도현
경기도 용인시 처인구 명지로 116, 216호 (남동, 기계공학과 제1공학관)
송진
경기도 용인시 처인구 명지로 116, 433호(남동, 기계공학과 제1공학관)
네비유 아레가 게타츄
경기도 용인시 처인구 명지로 116, (남동, 기계공학과 제1공학관)
- (74) 대리인
팬코리아특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

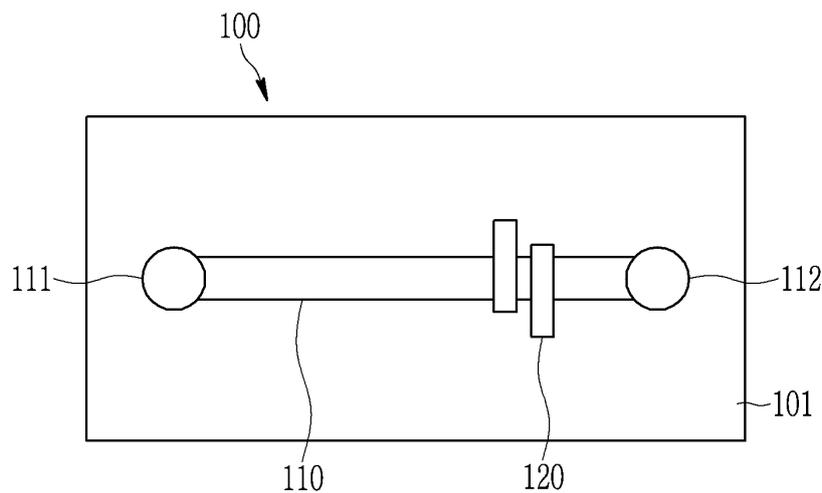
심사관 : 고원규

(54) 발명의 명칭 단일 지점 검출 방식 미소유체 등전점 전기영동 및 미소유체 칩

(57) 요약

단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동이 제공된다. 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동은 양 말단에 각각 전극액이 저장되는 제1 및 제2 전극부와 상기 제1 및 제2 전극부 사이의 미소유체 채널을 포함하는 미소유체 칩을 사용하는 미소유체 칩 등전점 전기영동에 있어서, 상기 제1전극부와 제2 전극부에 각각 전극을 연결하여 전기장을 가하여 생체분자를 등전점으로 분리하는 포커싱 단계, 상기 제1 전극부 또는 제2 전극부에 존재하는 전극액을 제거하여 상기 포커싱된 생체분자를 검출지점으로 이동시키는 가동화(mobilization) 단계 및 상기 검출지점으로 이동한 생체분자를 측정하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



(56) 선행기술조사문헌

US20120160691 A1*

WO2016090064 A1*

US20050224350 A1*

'랩온어칩 디바이스의 증발냉각 기반 온도제어 및 비접촉식 단백질 측정방법에 관한 연구', 송진, 석사학위논문, 명지대학교, 2016, 45-58 (2016.02.)*

KR101521879 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

양 말단에 각각 전극액이 저장되는 제1 및 제2 전극부와 상기 제1 및 제2 전극부 사이의 미소유체 채널을 포함하는 미소유체 칩을 사용하는 미소유체 칩 등전점 전기영동에 있어서,

담체양성전해질과 생체분자가 혼합된 유체를 상기 미소유체 채널에 주입하는 유체 주입 단계;

상기 제1전극부와 제2 전극부에 각각 전극을 연결하여 전기장을 가하여 상기 생체분자를 등전점으로 분리하는 포커싱 단계;

상기 제1 전극부 또는 제2 전극부에 존재하는 전극액을 제거하여 상기 포커싱된 생체분자를 검출지점으로 이동시키는 가동화(mobilization) 단계; 및

상기 검출지점으로 이동한 생체분자를 측정하는 단계를 포함하되,

상기 유체 주입 단계는

상기 제1 전극부와 연결된 분리 채널, 일단은 상기 분리 채널과 연결되고 타단은 상기 제2 전극부와 연결되는 측정 채널, 상기 분리 채널과 상기 측정 채널이 접하는 정션 부위에서 분기되고 제3 전극부와 연결된 보조 채널에 담체양성전해질과 상기 생체분자가 혼합된 유체를 주입하는 제1 단계;

상기 제1 전극부를 막은 상태에서 상기 제2 전극부와 상기 제3 전극부에 전극액을 채우고 진공을 가하여 상기 담체양성전해질과 상기 생체분자가 혼합된 유체가 상기 분리 채널에만 존재하도록 하고 상기 측정 채널과 상기 보조 채널에는 상기 전극액이 채워지도록 하는 제2 단계를 포함하고,

상기 가동화 단계는 상기 제3전극부를 막아 유체의 흐름을 제한하고, 상기 제2 전극부의 상기 전극액을 제거하여 상기 포커싱된 생체분자를 상기 측정 채널의 검출지점으로 이동시키는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미소유체 채널은 상기 제1 전극부와 연결되고, 상기 생체분자가 주입되고, pH 구배를 가지며 전기장의 인가에 의해 상기 생체분자가 등전점으로 포커싱되도록 하는 분리 채널; 및

일단은 상기 분리 채널과 연결되고 타단은 상기 제2 전극부와 연결되고, 상기 전극액이 주입되며, 상기 제2 전극부의 전극액을 제거시 상기 포커싱된 생체분자가 가동화되어 위치하는 측정 채널을 포함하는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전극액을 제거하는 것은 주사기 또는 피펫으로 진행하는 것인 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 유체 주입 단계 전에 상기 미소유체 채널의 내부를 메틸셀룰로오스(methyl cellulose, MC), 및 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), HPMC((Hydroxypropyl)methyl cellulose, HPMC), 선형 폴리아크릴아미드(Linear Polyacrylamide, LPA) 중에서 선택되는 1이상의 코팅용액으로 코팅하는 단계를 더 포함하는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 검출지점으로 이동한 생체분자를 측정하는 단계는 상기 미소유체 채널 상에 설치된 전극을 사용하여 측정하는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 전극은 종방향으로는 평행하되 횡방향으로는 어긋나게 배열된 전극 쌍을 포함하는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 전극은 전기전도도의 국부적인 변화를 측정하는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 방법.

청구항 12

제1 전극부와 제2 전극부

상기 제1 전극부와 연결되고, 생체분자가 주입되고, pH 구배를 가지며 전기장의 인가에 의해 상기 생체분자가 등전점으로 포커싱되도록 하는 분리 채널; 및

일단은 상기 분리 채널과 연결되고 타단은 상기 제2 전극부와 연결되고, 전극액이 주입되며, 상기 제2 전극부의 전극액을 제거시 상기 포커싱된 생체분자가 가동화되어 위치하는 측정 채널을 포함하되,

상기 분리 채널과 상기 측정 채널이 접하는 정션 부위에서 분기되고, 상기 전극액이 주입되는 보조 채널을 더 포함하는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩.

청구항 13

삭제

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 보조 채널의 폭은 상기 측정 채널의 폭과 동일하거나 작은 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 보조 채널의 폭은 10 μ m 이하인 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 보조 채널의 길이는 상기 측정 채널의 길이와 동일하거나 작은 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩.

청구항 17

제12항에 있어서,

상기 보조 채널과 상기 측정 채널이 이루는 각도는 45도 내지 135도인 단일지점 검출 방식의 미소유체 칩.

청구항 18

제12항에 있어서,

상기 측정 채널 상에 상기 생체분자에 의한 국부적인 전기전도도 변화를 측정하기 위한 전극을 포함하는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 등전점 전기영동에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 단일 지점 검출 방식 미소유체 등전점 전기영동 및 이를 적용하기 위한 미소유체 칩에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 등전점 전기영동(isoelectric focusing, IEF)은 생체분자 고유의 등전점을 기준으로 단백질, 아미노산, DNA, RNA, 세포, 바이러스 등을 분리, 분석하는 기술이다. 특히 등전점 전기영동은 단백질의 이형(isoform), 번역후 변형(post-translational modification), 유전자조합을 통한 단백질의 개질 등을 분석하는 데에 보편적으로 사용된다.

[0003] 등전점 전기영동의 적용분야가 확대됨에 따라 등전점 전기영동을 실시하기 위한 미소유체 칩의 소형화 및 단순화에 대한 요구 또한 증대하고 있다. 특히, 현장현시검사(point-of-care)가 가능하도록 하기 위해서는 미소유체 칩의 소형화와 함께 검출 장비 또한 소형화 단순화될 필요성이 점차 증대하고 있다.

[0004] 현재까지 개발되어 시판되고 있는 IEF 시스템은 대부분 형광 검출 기반의 전체 컬럼 이미징(whole-column imaging) 시스템으로 형광현미경과 같은 부피가 크고 고가인 광학 스캐너나 동력화된 테이블(motorized table)을 이용하기 때문에 정밀한 기계장치 및 제어장치가 필요하다. 또한 형광 검출을 위해서는 형광 레이블링 과정을 필수적으로 요구하기 때문에 분석과정이 복잡하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 개시는 단일 지점 검출 방식의 등전점 전기영동 분석을 제공하고자 한다.

[0006] 본 개시는 단일 지점 검출 방식의 등전점 전기영동 분석을 실시할 수 있는 미소유체 칩을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 실시예들에 따른 단일 지점 검출 방식의 등전점 전기영동 분석은 양 말단에 각각 전극액이 저장되는 제1 및 제2 전극부와 상기 제1 및 제2 전극부 사이의 미소유체 채널을 포함하는 미소유체 칩을 사용하는 미소유체 칩 등전점 전기영동에 있어서, 담체양성전해질과 생체분자가 혼합된 유체를 상기 미소유체 채널에 주입하는 유체 주입 단계, 상기 제1전극부와 제2 전극부에 각각 전극을 연결하여 전기장을 가하여 상기 생체분자를 등전점으로 분리하는 포커싱 단계, 상기 제1 전극부 또는 제2 전극부에 존재하는 전극액을 제거하거나 상기 제1전극부 또는 제2 전극부에 전극액을 충전하여 상기 포커싱된 생체분자를 검출지점으로 이동시키는 가동화(mobilization) 단계,

및 상기 검출지점으로 이동한 생체분자를 측정하는 단계를 포함한다.

[0008] 실시예들에 따른 단일 지점 검출 방식의 등전점 전기영동 분석을 위한 미소유체 칩은 제1 전극부와 제2 전극부, 상기 제1 전극부와 연결되고, 생체분자가 주입되고, pH 구배를 가지며 전기장의 인가에 의해 상기 생체분자가 등전점으로 포커싱되도록 하는 분리 채널, 및 일단은 상기 분리 채널과 연결되고 타단은 상기 제2 전극부와 연결되고, 전극액이 주입되며, 상기 제2 전극부의 전극액을 제거시 상기 포커싱된 생체분자가 가동화되어 위치하는 측정 채널을 포함한다.

발명의 효과

[0009] 실시예들에 따른 단일 지점 검출 방식의 등전점 전기영동 분석은 미소유체 칩의 소형화와 함께 검출 장비 또한 소형화시킬 수 있으므로 기존의 복잡하고 고가의 광학장비에 의존하고 있는 단백질 분석 시스템을 개선할 수 있다.

[0010] 실시예들에 따른 단일 지점 검출 방식의 등전점 전기영동 분석은 형광 기반의 전체 컬럼 이미징과 달리 필수적이었던 형광 레이블링 과정을 생략할 수 있어서 생체분자 분석과정을 간소화할 수 있고 측정부가 단순하기 때문에 검출 장비의 소형화할 수 있다.

[0011] 실시예들에 따른 단일 지점 검출 방식에서 검출 방식을 비접촉식 전도도법을 적용하면 생체분자 분석 시스템이 전기적인 요소로만 이루어지게 되므로 미소유체 칩을 소형화 및 단순화할 수 있다. 따라서, 휴대가능하고 현장 현시검사가 가능한 장치의 개발이 용이해질 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩(microfluidic chip)의 개요도이다.
- 도 2은 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩의 전극 배열을 도시한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동의 흐름도이다.
- 도 4a 내지 도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩을 이용한 미소유체 칩 등전점 전기영동 과정을 도시한 개요도들이다.
- 도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 가동화 방식을 설명하기 위한 개요도이다.
- 도 6a 내지 도 6c는 본 발명의 다른 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩을 이용한 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 과정을 도시한 개요도들이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동의 수치 시뮬레이션(numerical simulation) 결과를 도시한 것이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 실시 예를 상세하게 설명한다. 본 발명의 구성 및 그에 따른 작용 효과는 이하의 상세한 설명을 통해 명확하게 이해될 것이다.

[0014] 본 발명의 상세한 설명에 앞서, 동일한 구성요소에 대해서는 다른 도면 상에 표시되더라도 가능한 동일한 부호로 표시하며, 공지된 구성에 대해서는 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 구체적인 설명은 생략하기로 함에 유의한다. 도 1은 일 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩(microfluidic chip)(100)의 개요도이다. 미소유체 칩(100)은 기관(101), 기관(101) 내의 미소유체 채널(110) 및 복수개의 전극(120)을 포함한다. 또한 상기 미소유체 칩(100)은 미소유체 채널(110)의 양단에 연결된 양극부(111) 및 음극부(112)를 더 포함할 수 있다.

[0015] 기관(101)은 미소유체 채널(110)을 형성하기에 적합한 물성을 가지고 있는 소재라면 무엇이든 적용 가능하다. 예를 들면, 유리, 석영, 용융실리카, PMMA(poly methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer), PC(polycarbonate), PDMS(polydimethylsiloxane) 등으로 형성될 수 있다. 미소유체 채널(110)은 유체에 이동경로를 제공한다. 일 예로 미소유체 채널(110)은 관형인 것이 바람직하다. 예를 들어 미소유체 채널(110)은 관경(pipe diameter)이 75 내지 100 μm이며 관의 단면이 원 또는 다각형인 관(pipe)일 수 있다.

- [0016] 또한 미소유체 채널(110)의 내부면은 메틸셀룰로오스(methyl cellulose, MC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), HPMC((Hydroxypropyl)methyl cellulose, HPMC), 선형 폴리아크릴아미드(Linear Polyacrylamide, LPA) 중에서 선택되는 1이상의 코팅용액으로 코팅되는 것이 바람직하다. 미소유체 채널(110)의 내부면을 코팅용액으로 코팅하면, 분석하고자 하는 생체분자가 미소유체 채널의 내부면에 흡착되는 것을 방지할 뿐만 아니라 전기장을 인가하였을 때 발생하는 전기삼투 유동을 감소시켜 전기영동 분해능이 개선된다. 또 상기 코팅용액은 미소유체 채널에 포함되는 담체양성전해질(carrier ampholyte, CA)에도 첨가할 수 있다. 담체양성전해질에 코팅용액을 첨가하는 것은 첨가된 코팅용액이 생체분자의 확산을 방해하여 더 얇은 단백질 피크로 포커싱 되도록 하고 미소유체 채널 내부면의 코팅이 손상되는 것을 방지하기 위함이다.
- [0017] 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩(100)에서는 광학적인 검출 방식과 전기적인 검출 방식 모두 사용이 가능하다. 전기적인 검출 방식에는 전압법, 전류법, 전도도법, 비접촉식 전도도법 등이 가능하며, 도 1에는 미소유체 칩(100)의 소형화 및 단순화를 위해서 비접촉식 전도도법을 적용하기 위한 전극(120)이 예시되어 있다. 비접촉식 전도도법을 적용하면 전극을 미소유체 채널(110) 내에 삽입할 필요가 없으므로 공정이 단순화되고 전기 분해에 의한 기포 발생, 전기화학반응으로 생성된 불순물에 의한 오염 등의 부작용을 최소화할 수 있다. 전극(120)은 복수개의 전극을 포함한다. 전극(120)은 미소유체 채널(110)과 간접적으로 접촉되어 있다. 상기 전극(120)과 미소유체 채널(110)의 접촉 위치는 한정하지 않으며, 미소유체 채널(110) 내에 존재하는 미소유체에 전기장을 가할 수 있도록 간접적으로 접촉되면 족하다.
- [0018] 또한 일 실시예로서 전극(120)은 미소유체칩(100)의 표면에 반도체 공정, 실크스크리닝 기법 또는 전도성잉크로 패터닝 될 수 있다.
- [0019] 또한 다른 실시예로서 전극(120)이 패터닝 된 PCB 기판을 미소유체 칩에 클램핑(clamping)시킬 수도 있다. 전극이 패터닝 된 PCB 기판을 클램핑 시키는 것이 미소유체 칩에 전극을 형성하기 위한 추가적인 공정이 필요하지 않고, 전극을 재사용할 수 있으므로 비용면에서 유리하나, 접촉 정도에 따라 커패시턴스가 바뀌므로 검출된 출력신호의 양태가 변화될 수 있다.
- [0020] 전극(120)은 한 쌍을 포함하여 실시될 수 있다. 한 쌍의 전극 중 하나의 전극은 고주파 직류(AC) 신호를 입력해 주고, 다른 하나의 전극은 용액을 통과한 전류를 측정하는 형태로 실시될 수 있다. 미소유체 채널(110) 내부의 용액과 전극(120)사이에 존재하는 전극(120) 형성면은 앞서 언급한 COC, PDMS, PMMA, PC 등의 절연물질로 형성되기 때문에 전극에서 입력해주는 직류(DC) 신호를 전달하지 못한다. 그러나 고주파 직류(AC)전압을 인가하면 미소유체 채널(110) 내부의 용액과 기관(101)의 절연층 및 전극(120)으로 이루어진 커패시터(충전기)가 형성되면서 전류가 기관(101)의 절연층을 통과할 수 있게 된다. 절연층을 통과한 전류는 입력신호의 전압과 주파수에 영향을 받는다. 따라서 미소유체 채널 내의 용액의 전기전도도를 기준으로 하여, 생체분자와 용액의 전기전도도 차이를 이용하여 생체분자를 분석할 수 있다. 이와 같이 비접촉식 전도도 측정법을 사용하면 미소유체 칩(100)의 소형화 및 단순화가 가능하다. 또한 나아가서는 웨어러블 기기나 스마트 기기와의 통합에도 유리하다.
- [0021] 또한 전극(120)은 평행 배열(parallel array) 또는 역평행 배열(antiparallel array)로 배치 될 수 있다. 미소유체 채널(110)과 간접적으로 접촉하고 있는 전극(120)은 도 2a에 도시된 바와 같이 복수개의 전극이 미소유체 채널에 대하여 종방향으로 평행하게 배열될 수 있으며, 본 발명에서는 이를 평행 배열(parallel array)이라고 정의한다. 또한 도 2b에 도시된 바와 같이 복수개의 전극(120)은 미소유체 채널에 대하여 종방향으로 평행하되 횡방향으로 어긋나게 배열될 수 있으며, 본 발명에서는 이를 역평행 배열(antiparallel array)이라고 정의한다. 역평행 배열이 평행 배열에 비해 전기 배선면에 있어서는 복잡하나 신호대 잡음비(signal-to-noise ratio)가 우수하기 때문에 일반적으로 역평행 배열이 많이 사용된다.
- [0022] 이러한 전극이 미소유체 채널의 외부에 간접적으로 접촉된 미소유체 칩(100)을 사용하면 전극과 용액이 직접적으로 접촉하지 않는 비접촉식 전기전도도 측정 기반 미소유체 칩 등전점 전기영동을 수행 할 수 있다.
- [0023] 전극(120)은 전극으로 기능할 수 있는 어느 물질이라도 사용될 수 있으며, 금, 백금, 구리, 알루미늄, ITO, 전도성 고분자, 탄소 등으로 형성될 수 있다.
- [0024] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동의 흐름도이고, 도 4a 내지 도 4c는 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩의 등전점 전기영동(IEF) 과정을 도시한 개요도들이다. 도 3과 도 4a 내지 도 4c에서는 담체양성전해질(carrier ampholyte, CA)를 사용하는 CA-IEF를 설명하기 위한 도면들이다. 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동은 코팅 단계(S100), 유체 주입단계(S200), 포커싱(focusing) 단계(S300), 가동화(mobilization) 단계(S400) 및 전기전도도 측정단계(S500)를 포함한다.

- [0025] 도 4a는 코팅 단계(S100)와 유체 주입단계(S200)를 설명하기 위한 개요도이다. 코팅 단계(S100)은 미소유체 칩(100)의 미소유체 채널(110)의 내부면을 세정한 후, 코팅하는 단계이다. 일 예로 미소유체 채널(110)의 내부면은 MC, HEC, HPMC, LPA 중에서 선택되는 1이상의 코팅용액으로 코팅될 수 있다. 코팅 단계(S100)는 미소유체 채널(110) 내부면에 비특이적 단백질이 흡착하는 것을 방지하기 위한 것이다. 유체 주입 단계(S200)는 미소유체 채널(110)에 유체를 주입하는 단계로 생체분자(130), 담체양성전해질(CA), 및 MC, HEC, HPMC, LPA 중에서 선택되는 1이상의 코팅용액을 포함한 유체를 주입한 뒤, 미소유체 칩(100)의 양극부(Anode)(111)와 음극부(Cathode)(112)에 산성의 양극액 및 염기성의 음극액을 각각 주입하는 것이 바람직하다. 양극액은 70 mM 인산(H_3PO_4)와 같은 산성 용액, 음극액은 50 mM NaOH와 같은 염기성 용액을 사용할 수 있으며, 모두 전기삼투현상을 방지하기 위해 MC, HEC, HPMC, LPA등 점성이 높은 고분자 물질을 포함할 수 있다. 도 4a는 미소유체 칩(100)에 유체가 주입된 후 생체분자(130)가 미소유체 채널(100)에 불규칙적으로 분산되어 있는 상태를 나타낸다.
- [0026] 도 4b는 등전점 포커싱(IsoElectric Focusing, IEF) 단계(S300)를 설명하기 위한 개요도이다.
- [0027] 양극부(111)와 음극부(112)에 전극(140)을 삽입하고 일정 값 이상의 전위차를 인가하면 유체내에 포함되어 있는 CA가 pI(등전점) 순으로 배열되어 pH 구배를 형성한다. 이 때, 함께 로딩되어 있는 생체분자도 자신의 등전점으로 포커싱(분리 및 농축)하게 된다. CA-IEF는 생체분자(130)의 포커싱에 1시간 이하, 바람직하게는 30분 이하, 더욱 바람직하게는 10분 이하 정도 소요되며 IPG(Immobilized pH Gradient)-IEF에 비해 미소유체 칩(100)을 재사용할 수 있다는 장점이 있다.
- [0028] 생체분자(130)는 DNA, RNA, PNA(Peptide nucleic acid), LNA 등의 핵산(nucleic acid)류, 항원, 항체 등의 단백질(Protein)류, 올리고펩티드류, 인간세포, 동물세포, 식물세포 등의 세포류, 바이러스, 박테리아 등의 미생물류를 포함될 수 있다.
- [0029] 가동화(mobilization) 단계(S400)는 포커싱된 생체분자(130)를 검출지점으로 이동시키는 단계이다. 상기 검출지점은 미소유체 칩(100)에 배열되어 있는 전극(120)이 위치한 지점을 의미한다. 가동화 단계(S400)는 전극액을 제거하여 등전점 포커싱(IEF)된 생체분자(130)를 검출지점으로 이동시킬 수 있다. 이와 같은 가동화 단계(S400)를 통해서 단일 지점 검출이 가능해진다. 도 4c에서는 음극부(112)의 전극액을 전동 혹은 수동 주사기 또는 피펫(150) 등으로 정해진 양의 전극액을 제거하여 생체분자(130)를 음극부(112) 쪽으로 이동시키는 것을 예시하고 있다. 그러나, 전극(120)의 위치에 따라 양극부(111)의 전극액을 제거하여 생체분자(130)를 양극부(111) 쪽으로도 이동시킬 수 있음은 물론이다.
- [0030] 이와 같이 전극액을 제거하여 가동화하는 방식은 종래의 화학적 가동화 방식, 전기삼투유동 가동화 방식, 또는 압력차에 의한 가동화 방식 대비 미소유체 칩(100)의 소형화 및 단순화에 매우 유리하다. 화학적 가동화 방식은 전기영동 가동화방식이라고도 불린다. 양극 방향으로 가동화 하기 위해서는 양극부의 양극액(산성)에 염기성용액이나 염화나트륨 같은 염(salt)을 첨가한다. 반대로 음극방향으로 가동화 하기 위해서는 음극 용액(염기성)을 산성 용액으로 대체하거나 염을 첨가한다. 이 방식은 가동화 시 pH 구배(gradient)가 파괴되어 단백질이 농축된 픽(peak)이 열화되어 해상도가 감소한다는 단점이 있다.
- [0031] 전기삼투유동 가동화(electroosmotic flow mobilization)는 전기영동 시 모세관 벽이 대전되어 전기삼투유동이 생기는 것을 이용한다. 전기삼투유동은 유체가 접촉하는 채널의 표면특성에 영향을 많이 받으므로 유동의 유속과 방향을 예측하기가 어려우므로, 이를 이용하여 단백질의 이동을 제어하는 것이 어렵다.
- [0032] 압력차에 의한 가동화(pressure mobilization) 방식은 수력학적 가동화(hydraulic mobilization)라도고 불리며, 압력 또는 진공을 가하여 등전점 전기영동으로 포커싱 된 단백질을 검출지점으로 이동시킨다. 압력차에 의한 가동화 방식은 이동 중에 pH 구배가 파괴되는 것을 방지하기 위해, 채널에 전기장을 인가한 상태에서 수행한다. 압력 가동화 방식은 펌프를 이용하여 구현하는 것이 일반적이다. 펌프를 양극부 또는 음극부에 연결하기 위해서는 주입 루프(injection loop)와 투석 막막(dialysis membrane) 등 복잡한 부가장치가 필요하다. 또한 고압을 발생시키는 펌프는 소형화에 한계가 있고 전력소모도 크므로 휴대 가능한 현장현시검사(point-of-care) 장치에는 부적절하다. 반면, 본 발명의 실시예와 같이 음극액 또는 양극액과 같은 전극액을 제거하는 방식은 양극부(111)와 음극부(112)에 IEF를 위한 전극이 설치되어 있는 상태에서 주입 루프(injection loop), 투석 막막(dialysis membrane) 등을 설치하기 위한 어려움을 해결할 수 있다. 또한, 전극액의 양을 일정하게 유지하는 것이 등전점 전기영동으로 분리된 단백질들의 형태를 유지하는데 필요하다고 생각하는 것이 당업자의 상식이므로 전극액을 제거하는 방식은 이와 같은 상식을 뛰어넘는 새로운 방식이다. 그리고, 기존의 모세관 IEF(CIEF) 혹은 Capillary IEF)의 경우에는 수십~수백 cm에 이르는 긴 모세관 (capillary)에 항상 펌프를 통해 샘플을 주입하는

것이 일반화 되어 있으므로, 기존에 설치되어 있는 샘플 주입용 펌프를 이용하려는 것이 당업자의 기술 수준이라는 점에 비추어 볼 때 비자명한 방식임을 알 수 있다.

[0033] 마지막으로 전기전도도 측정 단계(S500)에서는 검출지점으로 이동 된 생체분자(130)의 전기전도도를 측정한다. 도 4c와 같이 생체분자(130)가 검출지점으로 이동하였을 때, 전기전도도가 국부적으로 감소된다. 전기전도도의 국부적인 감소를 감지함으로써, 생체분자를 분석할 수 있다. 일례로 단백질은 담체양성전해질(CA)보다 표면 전하가 많고 겔보기 이동도가 더 작다. 그렇기 때문에 전하 중성 조건(electroneutrality condition)을 유지하기 위하여 단백질이 포커싱된 지점의 담체양성전해질 농도가 감소해야 하므로 전기전도도가 국부적으로 낮아져 역 피크가 관찰된다.

[0034] 도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 가동화 방식을 설명하기 위한 개요도이다. 가동화는 도 4b에 예시되어 있는 바와 같이 전극액을 제거하는 방식으로도 진행할 수 있지만 도 5에 예시되어 있는 바와 같이 피켓 (150)을 사용하여 전극액을 충전하는 방식으로도 진행할 수 있다. 도 5에는 양극부에 전극액을 충전해서 가동화를 하는 것이 예시되어 있다. 전극액을 제거하는 것 대신 전극액을 충전하는 것은 등전점 전기영동을 매우 오래 수행하여 양극액 혹은 음극액이 해당 전극에서 발생하는 전기 분해에 의해 pH가 변할 우려가 있는 경우에 효과적일 수 있다. 전극액을 충전함으로써 안정적인 등전점 전기영동을 수행할 수 있게 된다.

[0035] 도 6a 내지 도 6c는 본 발명의 다른 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩을 이용한 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩 등전점 전기영동 과정을 도시한 개요도들이다.

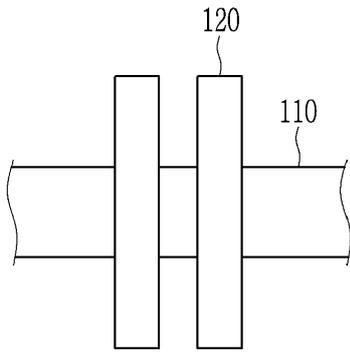
[0036] 도 6a를 참조하면, 또 다른 실시예에 따른 단일 지점 검출 방식의 미소유체 칩(200)은 단일 채널이 아니라 분리 채널(210)과 측정채널(240)로 구분된 채널 구조를 가진다. 분리채널(210)과 측정채널(240) 사이에는 정선(J)이 존재하게 된다. 또한 분리채널(210)과 측정채널(240)의 형성을 용이하게 하기 위한 보조채널(250)을 더 포함할 수 있다. 보조채널(250)은 분리채널(210)과 접하는 정선(J) 부위에서 분기되고 아래에서 설명하는 유체 주입 단계(S200)시 전극액이 주입된다. 양극부(211)와 정선(J) 사이가 분리채널(210), 음극부 1(212)과 정선(J) 사이가 측정채널(240), 음극부2(214)와 정선(J)이 보조채널(250)이 된다. 검출을 위한 전극(220)이 측정 채널(240) 상에 형성되어 검출지점(222)이 전극(220) 사이에 놓이게 된다.

[0037] 도 6a는 코팅 단계(S100)과 유체 주입 단계(S200)을 설명하기 위한 개요도이다.

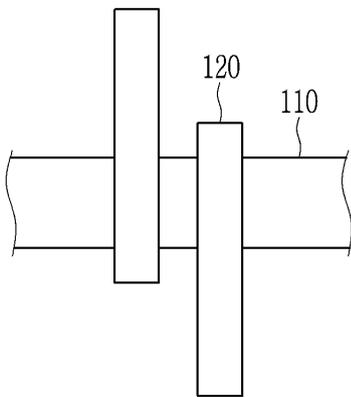
[0038] 분리채널(210), 측정채널(240), 보조채널(250)의 내부면을 세정한 후 MC, HEC, HPMC, LPA 등으로 코팅을 한 후, 양극부(211), 음극부1(212), 음극부2(214)를 통해 분리채널(210), 측정채널(240) 및 보조채널(250)에 담체 양성전해질(CA), 생체분자, 코팅용액으로 구성된 유체를 채운다. 이어서 양극부(211)에 뚜껑을 씌워서 유체의 흐름이 없도록 막은 상태에서 음극부1(212)과 음극부2(214)에 음극액을 채우고 진공을 가하면 보조채널(250)과 측정채널(240)을 음극액으로 채울 수 있게 된다. 보다 구체적으로 양극부(211)에 뚜껑을 막고 음극부1(212)과 음극부2(214)에 음극액을 채우고 음극부1(212)에 진공을 가하게 되면 양극부(211)의 뚜껑을 막았기 때문에 음극액이 측정채널(240), 보조채널(250) 순으로 달려오면서 두 개의 채널(250, 240)이 음극액으로 차게 된다. 그 결과 측정채널(240)에 채워져 있던 담체양성전해질(CA)이 음극액으로 대체(replace)되어 분리채널(210)에만 담체양성전해질이 존재하게 되고, 분리채널(210)과 측정채널(240)이 접하는 위치에 담체양성전해질과 음극액이 접하여 정선(J)이 형성되게 된다. 반대로 양극부(211)에 뚜껑을 막고 음극부1(212)과 음극부2(214)에 음극액을 채우고 음극부2(214)에 진공을 가하게 되면 양극부(211)의 뚜껑을 막았기 때문에 음극액이 측정채널(240), 보조채널(250) 순으로 달려오면서 두 개의 채널(250, 240)이 음극액으로 차게 된다. 이 때 채워지는 음극액의 양은 1 μ L의 극미량이므로 이후 분석에는 영향을 미치지 않는다. 보조채널(250)의 폭은 음극액의 흐름에 적합할 정도의 폭이면 되므로 측정채널(240)의 폭과 동일하거나 그 보다 작아도 상관없다. 예를 들면, 보조채널(250)의 폭은 10 μ m 이하일 수 있다. 또한 보조채널(250)의 길이는 분리채널(210)의 형성에 적합할 정도의 길이이면 되므로 반드시 측정채널(230)의 길이와 동일할 필요는 없으며 그 보다 작을 수도 있다. 또한 보조채널(250)은 분리채널(210) 또는 측정채널(240)과 반드시 수직일 필요는 없으며 전극(220)과 접촉하지 않는 한에서는 다양한 각도로 형성될 수 있다. 전기적 방법으로 측정할 경우에는 전극(220)과 가능한 접촉하지 않도록 분리채널(210) 방향으로 경사지도록 형성하면 미소유체 칩(200)의 크기를 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 예를 들면 보조채널(250)과 측정채널(240)이 이루는 각도가 135도 이상이 되도록 할 수 있다. 한편, 측정 방법을 전극(220)을 사용하지 않는 광학적 방법으로 할 경우에는 보조채널(250)을 측정채널(240)쪽으로 경사지게 하거나 분리채널(210) 방향으로 경사지게 하는 것이 모두 가능하다. 다만 보조채널(250)의 형성의 편의성을 위해서 보조채널(250)과 측정채널(240)이 이루는 각도는 45도 내지 135도 범위인 것이 바람직할 수 있다.

- [0039] 도 6b는 등전점 포커싱(IEF) 단계(S300)을 설명하기 위한 개요도이다.
- [0040] 양극부(211)와 음극부1(212)에 전극액(약 20~30 μ L)액을 채운 후, 양극부(211)에 양극을 음극부1(212)에 음극을 삽입한 뒤, 전기장을 가하면 생체분자는 분리채널(210)상에서 자신의 등전점으로 포커싱(분리 및 농축)하게 된다. 즉 측정채널(240)의 좌측에 배치된 분리채널(210)에만 생체분자의 등전점에 따라 산성에서부터 염기성까지 생체분자(230)가 포커싱하게 된다.
- [0041] 도 6c는 가동화 단계(S400)를 설명하기 위한 개요도이다.
- [0042] IEF가 완료된 후 음극부2(214)에 뚜껑을 씌워서 유체의 흐름을 제한하고 음극부1(212)의 음극액을 제거하면 분리채널(210)상의 용액이 점차 측정채널(240) 쪽으로 가동하므로 등전점으로 분리된 단백질이 순차적으로 검출지점(220)으로 이동하게 된다. 가동화된 생체분자(230)들이 검출지점에 다다랐을 때 광학적인 혹은 전기적인 방법으로 단백질의 양을 신호로 읽어내어 측정할 수 있다.
- [0043] 일자 채널을 이용할 경우에는 집적도 향상이라는 장점이 있지만 일자 채널 전체에 걸쳐서 pH 구배가 형성되고 여기에 포커싱이 일어나므로 검출 지점(222)과 음극부(122) 사이에 농축된 강염기성 단백질은 검출이 어려울 수 있다. 마찬가지로 검출 지점(222)을 양극부 근처에 두면 두 지점 사이에 농축된 강산성 단백질을 검출이 어려울 수 있다. 반면, 도 6a 내지 도 6c를 참고하여 설명한 T자 채널을 이용할 경우 pH구배가 분리채널(210)에서만 생성되고 이를 검출 지점(222)으로 가동화하기 때문에 pH 구배 범위안에 있는 모든 단백질의 검출이 가능할 수 있다.
- [0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0045] 실시예 1. 비접촉식 전기전도도 측정 기반 미소유체 칩 등전점 전기영동의 수치 시뮬레이션(Numerical simulation)은 Simul 5 소프트웨어를 사용하여 단백질의 비접촉식 전기전도도 측정 기반 미소유체 칩 등전점 전기영동을 수행하였다. 10 mm 마이크로 유체 채널, pH 3 내지 10에서의 0.625 mM 담체양성전해질(CA), 10 μ M 녹색형광단백질(GFP), 70 mM H_3PO_4 양극액 및 50 mM NaOH 음극액, 200 V 분리 전압을 입력으로 사용하였다. 또한 시간 및 위치의 함수로서의 전도도 및 농도 데이터를 수집 및 분석하였다. 수치 시뮬레이션 결과는 도 7에 도시하였다. 도 7a는 미소유체 채널의 위치에 따른 단백질 농도를 시뮬레이션으로 추정된 결과이다. 상기 도 7a를 보면 두 단백질 바운더리가 미소유체 채널의 양 끝에서 포커싱 위치(등전점)로 이동한다(점선 화살표). 등전점 전기영동 시작 100초 후 포커싱 위치에서 하나의 단백질 합쳐져서 밴드로 나타난다(실선 화살표).
- [0046] 도 7b는 미소유체 채널의 위치에 따른 전기전도도를 시뮬레이션으로 추정된 결과이다. 도 7b를 보면 그림 7a의 단백질 바운더리의 위치를 추적하는 두 개의 역피크(reverse peak)(점선 화살표)가 시간이 지남에 따라 하나의 역피크(실선 화살표)로 합쳐져서 나타난다.
- [0047] 실시예 2. 비접촉식 전기전도도 측정 기반 미소유체 칩 등전점 전기영동을 통한 단백질 분석을 위하여, 한 쌍의 전극이 고정되어 있는 140 μ m 커버 슬립(cover slip)과 18mm 직선 미소유체 채널을 가진 환형 올레핀 공중합체(cyclic olefin copolymer) 미소유체 칩을 사용하였다. 상기 한 쌍의 전극은 전극 간 거리(electrode gap)는 0.7mm이다.
- [0048] 상기 미소유체 칩을 세정한 후 미소유체 채널 내부면을 4% 하이드록시 에틸 셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC)로 코팅하였다. 상기 HEC 코팅은 미소유체 채널 내부면에 비특이적 단백질이 부착되는 것을 방지하고 전기 삼투현상을 최소화하기 위함이다.
- [0049] 코팅된 미소유체 채널에 시료인 25 μ M 녹색형광단백질(GFP)과 2% 담체양성전해질(CA) 및 4% w/v HEC를 주입하였다. 주입된 HEC는 동적 코팅(dynamic coating)과 분리 매트릭스 기능을 한다. 또한 미소유체 채널의 양극부에 2% w/v HEC가 포함된 50mM 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하였다. 미소유체 채널의 음극부에는 2% w/v HEC가 포함된 70mM 인산(H_3PO_4)을 첨가하였다.
- [0050] 미소유체 채널에 pH구배 형성과 단백질을 포커싱을 위하여 100V의 분리전압을 인가하였다. 전압을 인가함에 따라 도 4b와 같이 시료인 녹색형광단백질이 등전점 위치에 포커싱 되었다.
- [0051] 포커싱된 녹색형광단백질을 검출지점까지 이동시키기 위하여 가동화(mobilization)를 수행하였다. 상기 가동화는 음극액을 10 μ L 제거함으로써 압력 또는 진공을 유도하였으며, 등전점 위치에 포커싱된 녹색형광단백질을

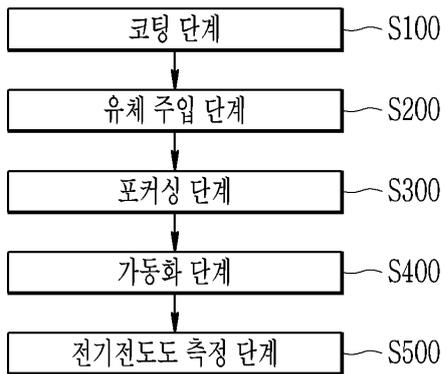
도면2a



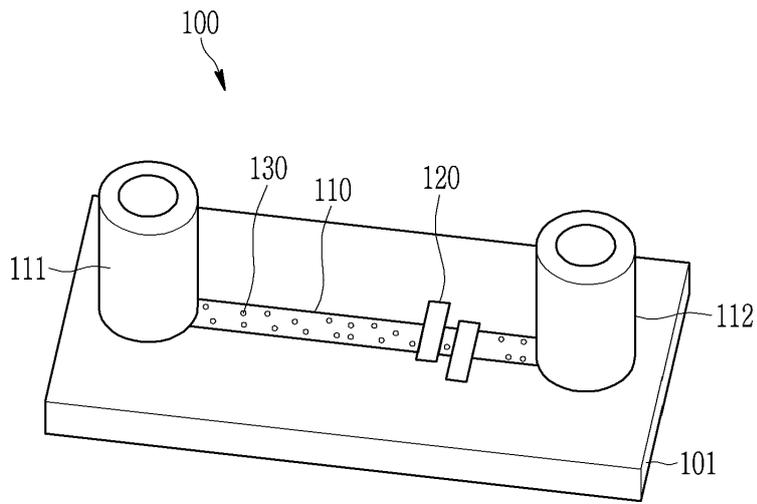
도면2b



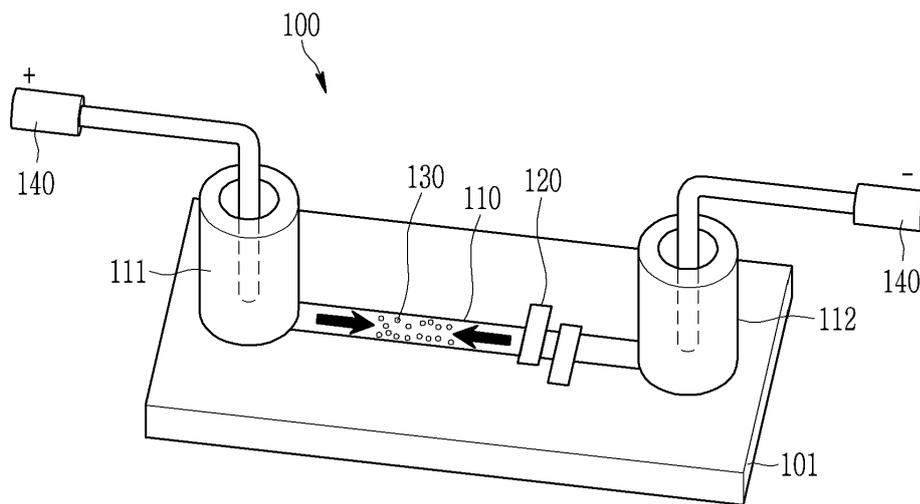
도면3



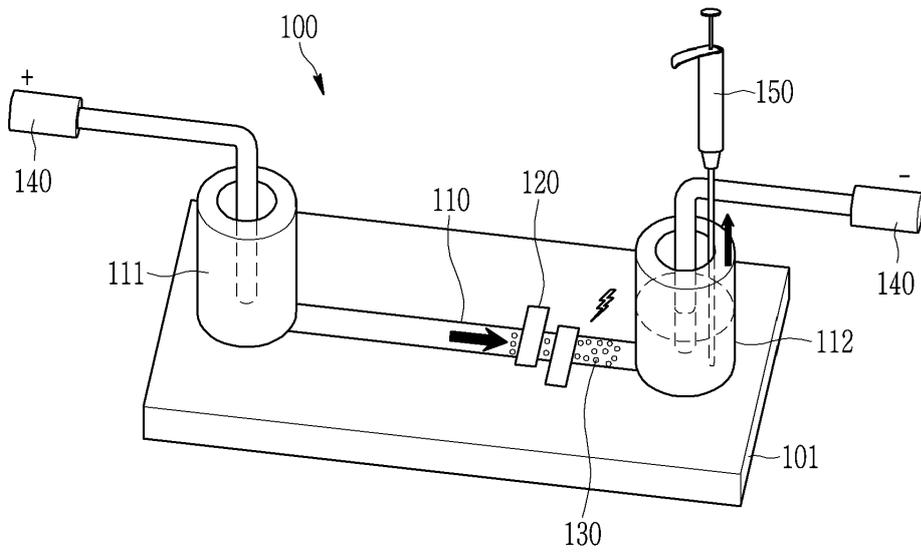
도면4a



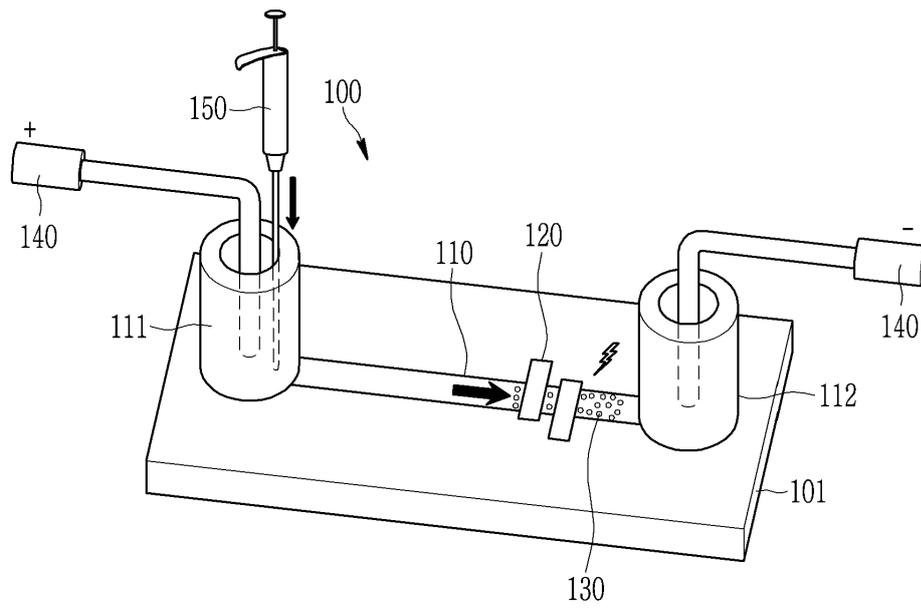
도면4b



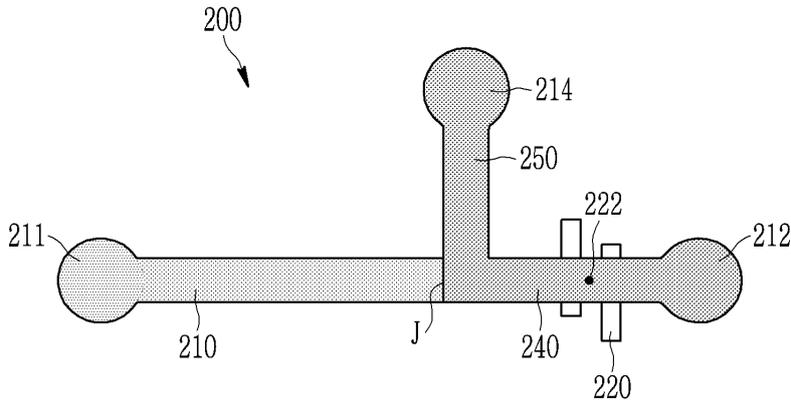
도면4c



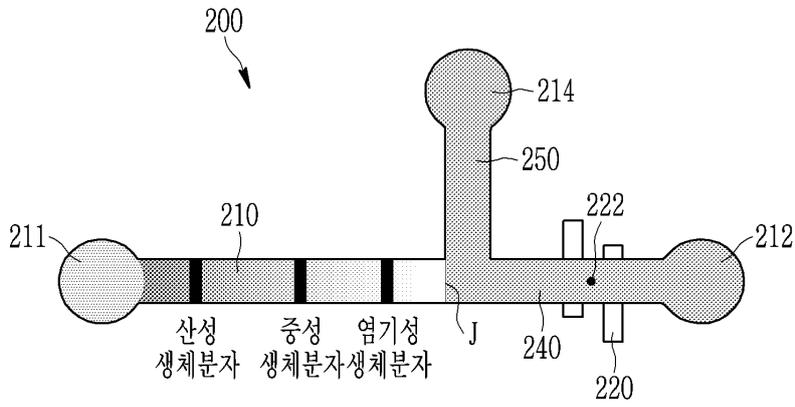
도면5



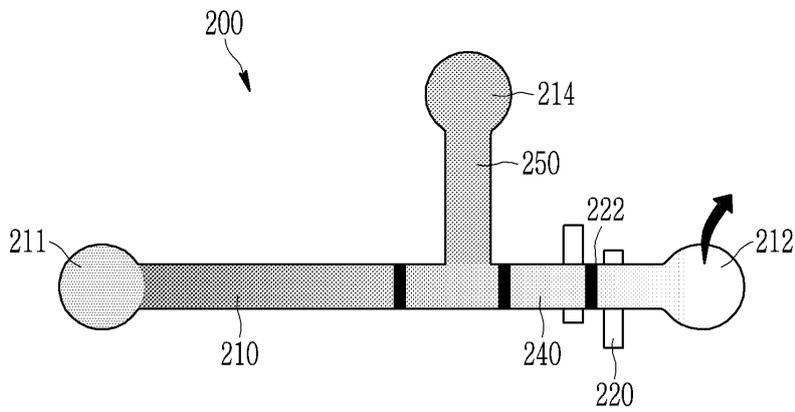
도면6a



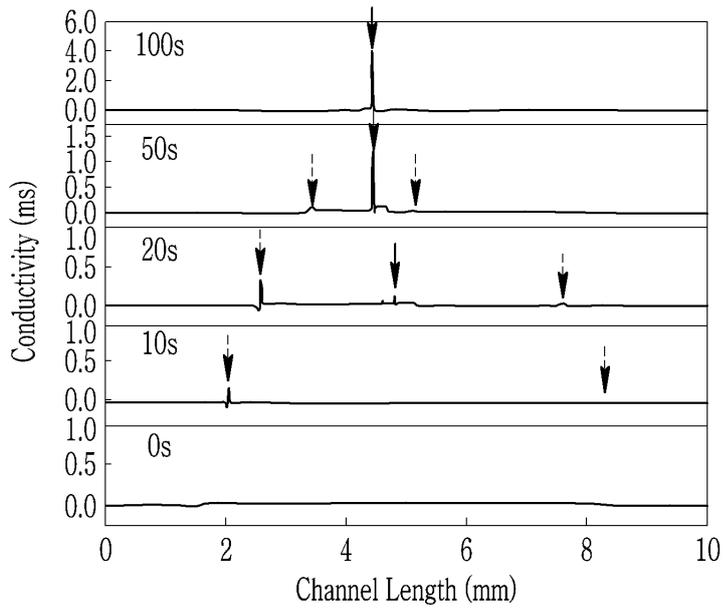
도면6b



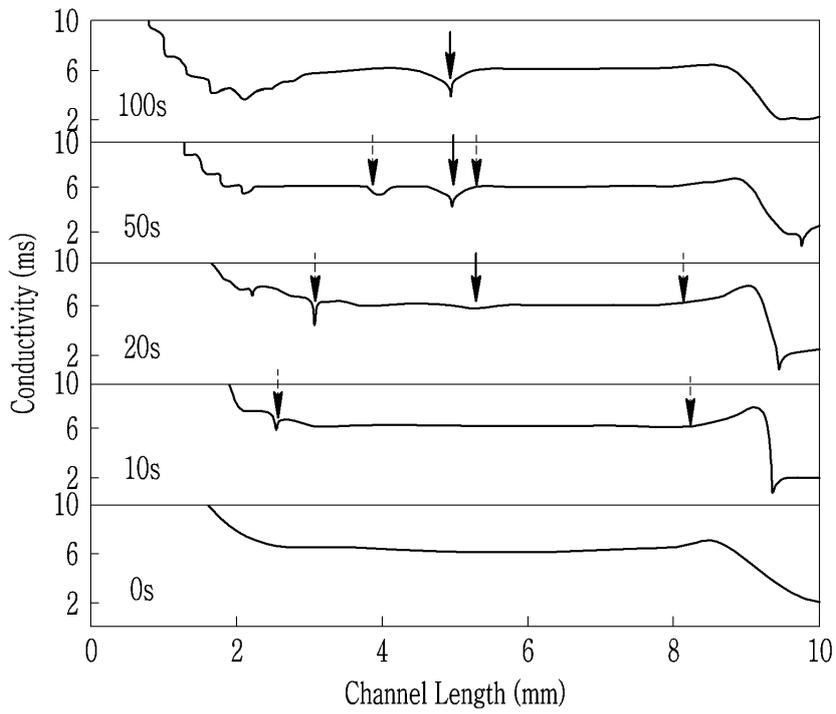
도면6c



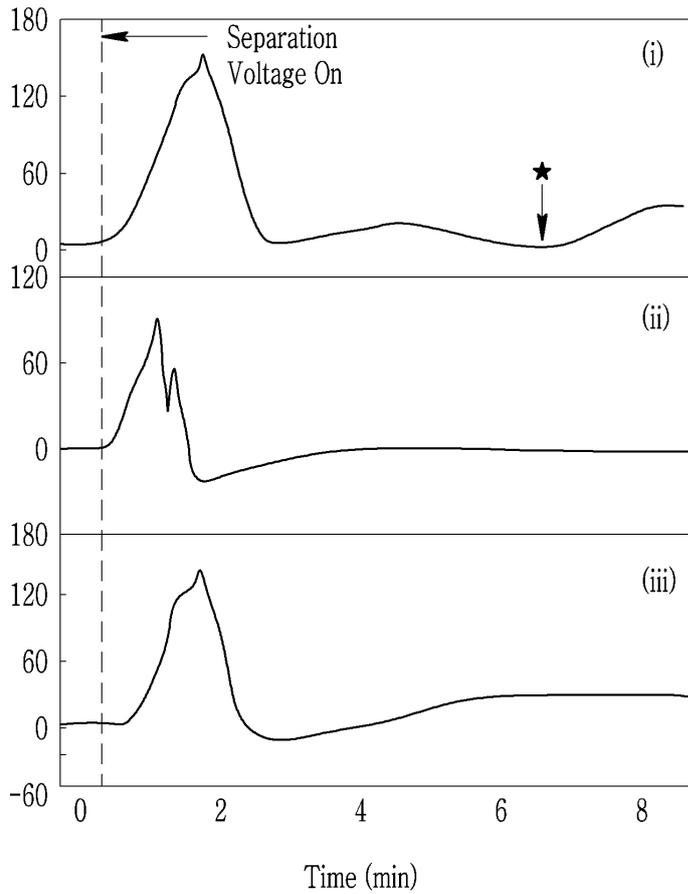
도면7a



도면7b



도면8a



도면8b

