



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월03일

(11) 등록번호 10-2222061

(24) 등록일자 2021년02월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/447 (2006.01) **G01N 27/453** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 27/4473 (2013.01)
G01N 27/44756 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0108250
- (22) 출원일자 2019년09월02일
 심사청구일자 2019년09월02일
- (65) 공개번호 10-2020-0026168
- (43) 공개일자 2020년03월10일
- (30) 우선권주장
 1020180103539 2018년08월31일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2007531863 A*
 (뒷면에 계속)
- (73) 특허권자
 연세대학교 원주산학협력단
 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
- (72) 발명자
최승엽
 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 산학관 212호
 (연세대학교 원주캠퍼스)
임종원
 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 산학관 212호
 (연세대학교 원주캠퍼스)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김보정

전체 청구항 수 : 총 23 항

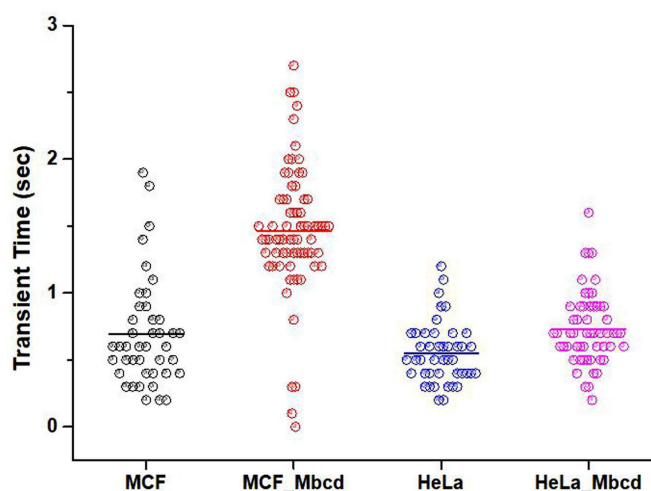
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법

(57) 요약

본 발명은 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포 희석액을 양 끝 단에 파형 발생기가 구비된 미세 유체 칩에 개재하는 미세유체칩 개재단계, 상기 미세 유체 칩의 양 끝 단에 구비된 파형 발생기에 전압을 인가하는 전압 인가단계 및 상기 전압 인가단계를 통해 전압이 인가된 미세 유체 칩에 개재된 세포 희석액 내에 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 촬영하고 그레이스케일(grayscale)의 과도시간을 통해 분석하는 세포움직임 분석단계로 이루어진다.

상기의 과정으로 이루어지는 세포 종류 구분 및 특성 분석법은 수득률이 높아 통계적으로 유의미한 데이터를 다량으로 축적할 수 있고, 주파수를 빠르게 바꿔주는 과정을 통해 매우 짧은 시간에 발생하는 분극 지연의 과정을 분석하여 세포의 종류와 특성을 분석할 수 있다.

대표도 - 도2

(52) CPC특허분류

G01N 27/453 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

(72) 발명자

이상현

강원도 원주시 흥업면 세동길 10-9, 202호

김채원

광주광역시 북구 서하로 120, 2동 604호(용봉동, 삼성아파트)

이상우

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 백운관 401호(연세대학교 원주캠퍼스)

고관휘

서울특별시 서대문구 연세로4길 46-7, 307

(56) 선행기술조사문헌

JP5186675 B2*

고관휘, 연세대학교 석사학위논문.(2018.02.18.)*

KR1020150114177 A

W02004055505 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B2002076

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 Nucleic acid 복합체부터 세포특성 분석을 위한 DEP tweezers 기반 신개념 미세유체 칩 플랫폼 개발 및 응용연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

세포 회석액을 양 끝 단에 파형 발생기가 구비된 미세 유체 칩에 개재하는 미세유체칩 개재단계;

상기 미세 유체 칩의 양 끝 단에 구비된 파형 발생기에 전압을 인가하는 전압 인가단계; 및

상기 전압 인가단계를 통해 전압이 인가된 미세 유체 칩에 개재된 세포 회석액 내에 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 촬영하고 그레이스케일(grayscale)의 밝기 변화를 만들어 낼 때까지 걸린 시간인 과도시간(transient time)을 통해 분석하는 세포움직임 분석단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 세포 회석액은 1 내지 100개/microliter의 농도로 버퍼에 희석되어 제조되는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 버퍼는 수크로오스, D-글루코스, 인산완충식염수 및 소혈청 알부민으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법.

청구항 4

청구항 2에 있어서,

상기 세포는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa) 및 폐암 세포(Jurkat)로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝 단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 1 내지 3Vp-p의 전압을 인가하되,

전압의 주파수를 0.5 내지 1.5kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 10 내지 500kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 2Vp-p의 전압을 인가하되,

전압의 주파수를 1.0kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 20 내지 200kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 유전영동은 아래 수학적 식 1로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법:

[수학적 식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m\text{Re}[f_{CM}]\nabla|E_{rms}|^2$$

여기서 ϵ_0 는 진공상태의 유전상수이고,

ϵ_m 은 유체의 유전상수이며,

$\text{Re}[f_{CM}]$ 은 Clausius-Mossotti factor의 실수 값이고,

f_{CM} 은 입자와 입자를 둘러싼 유체의 상대적인 분극 능력을 나타내는 값이며,

E_{rms} 전기장의 실효값이다.

청구항 8

이상 세포 희석액을 양 끝단에 파형 발생기가 구비된 미세 유체 칩에 개재하는 미세유체칩 개재단계;

상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 구비된 파형 발생기에 전압을 인가하는 전압 인가단계;

상기 전압 인가단계를 통해 전압이 인가된 미세 유체 칩에 개재된 이상 세포 희석액 내에 이상 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 촬영하고 그레이스케일(grayscale)의 밝기 변화를 만들어 낼 때까지 걸린 시간인 과도시간(transient time)을 통해 분석하는 세포움직임 분석단계; 및

상기 세포움직임 분석단계를 통해 분석된 데이터를 정상 세포의 데이터와 비교하는 데이터비교 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 이상 세포 희석액은 1 내지 100개/microliter의 농도로 버퍼에 희석되어 제조되는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 버퍼는 수크로오스, D-글루코스, 인산완충식염수 및 소혈청 알부민으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유

전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출방법.

청구항 11

청구항 8에 있어서,

상기 이상 세포는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa) 및 폐암 세포(Jurkat)로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출방법.

청구항 12

청구항 8에 있어서,

상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 1 내지 3Vp-p의 전압을 인가하되,

전압의 주파수를 0.5 내지 1.5kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 10 내지 500kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 2Vp-p의 전압을 인가하되,

전압의 주파수를 1.0kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 20 내지 200kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출방법.

청구항 14

청구항 8에 있어서,

상기 유전영동은 아래 수학적 식 1로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출방법:

[수학적 식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m\text{Re}[f_{CM}]\nabla|E_{rms}|^2$$

여기서 ϵ_0 는 진공상태의 유전상수이고,

ϵ_m 은 유체의 유전상수이며,

$\text{Re}[f_{CM}]$ 은 Clausius-Mossotti factor의 실수 값이고,

f_{CM} 은 입자와 입자를 둘러싼 유체의 상대적인 분극 능력을 나타내는 값이며,

E_{rms} 전기장의 실효값이다.

청구항 15

이상 세포 회석액(대조군)과 약물로 처리된 이상 세포 회석액(실험군) 각각을 양 끝 단에 파형 발생기가 구비된 미세 유체 칩에 각각 개재하는 미세유체칩 개재단계;

상기 미세 유체 칩의 양 끝 단에 구비된 파형 발생기에 전압을 인가하는 전압 인가단계;

상기 전압 인가단계를 통해 전압이 인가된 미세 유체 칩에 개재된 대조군 내에 이상 세포의 움직임과 실험군 내에 이상 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 촬영하고 그레이스케일(grayscale)의 밝기 변화를 만들어 낼 때까지 걸린 시간인 과도시간(transient time)을 통해 분석하는 세포움직임 분석단계; 및

상기 세포움직임 분석단계를 통해 분석된 대조군의 데이터와 실험군의 데이터를 비교하는 데이터비교 단계:로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

상기 이상 세포 회석액은 1 내지 100개/microliter의 농도로 버퍼에 희석되어 제조되는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 버퍼는 수크로오스, D-글루코스, 인산완충식염수 및 소혈청 알부민으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법.

청구항 18

청구항 15에 있어서,

상기 이상 세포는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa) 및 폐암 세포(Jurkat)로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법.

청구항 19

청구항 15에 있어서,

상기 약물은 이상 세포의 세포막 특성을 변화시키는 약물로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법.

청구항 20

청구항 15 또는 19에 있어서,

상기 약물은 Methyl- β -cyclodextrin으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한

변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법.

청구항 21

청구항 15에 있어서,

상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 1 내지 3Vp-p의 전압을 인가하되,

전압의 주파수를 0.5 내지 1.5kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 10 내지 500kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서,

상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 2Vp-p의 전압을 인가하되,

전압의 주파수를 1.0kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 20 내지 200kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법.

청구항 23

청구항 15에 있어서,

상기 유전영동은 아래 수학적 식 1로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법:

[수학적 식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m\text{Re}[f_{CM}]\nabla|E_{rms}|^2$$

여기서 ϵ_0 는 진공상태의 유전상수이고,

ϵ_m 은 유체의 유전상수이며,

$\text{Re}[f_{CM}]$ 은 Clausius-Mossotti factor의 실수 값이고,

f_{CM} 은 입자와 입자를 둘러싼 유체의 상대적인 분극 능력을 나타내는 값이며,

E_{rms} 전기장의 실효값이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 수득률이 높아 통계적으로 유의미한 데이터를 다량으로 축적할 수 있고, 주파수를 빠르게 바꿔주는 과정을 통해 매우 짧은 시간에 발생하는 분극 지연의 과정을 분석하여 세포의 종류와 특성을 분석할 수 있는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 세포는 주변의 환경이 변함에 따라서 자신의 환경을 유지시키는 특별한 전기적 성질을 가지고 있다. 이러한 전기적 성질은 의료 진단, 음식 위생, 신약 개발 등의 분야에서 다양한 정보를 제공하고 있다. 구체적으로, 질병의 단계에 따라서 세포의 전기적 성질이 바뀌게 되고, 새로 개발된 약물이 세포에 어떤 영향을 미치는지 등에 대한 연구에 사용된다. 세포의 전기적 특성을 조사하고 분석하는데, 세포막이 주요한 역할을 한다. 세포막은 세포 내부와 외부로 물리적으로 혹은 전기적으로 차단하고 세포의 형태를 유지한다. 세포막은 전기장 내에서 저항과 커패시터로 모델링이 된다. 세포에 외부 전기장이 가해졌을 때, 전하들이 세포막 주위에 분포되면서 분극을 만들어 낸다. 여기서 분극이란 세포막의 커패시터적인 성격과 관련이 되어 있고, 유전영동 실험에 있어서 개념적 토대가 되고 있다. 분극은 외부 전기장에 따라 다른 형태로 진행이 되는데, 예를 들어, 외부 전기장이 바뀌면 분극의 지연이 발생한다. 분극 지연은 세포가 외부의 자극에 얼마나 빠르게 적응하고 변화하는지를 알려주는 지표로 사용될 수 있으므로, 세포의 결함이나 병의 유무 등을 판단하는데 사용할 수 있을 것으로 예측된다.
- [0004] 따라서, 분극 지연에 대한 연구를 위해서, 미세 유체 칩 내에서 유전영동 기술 기반의 실험적 방법을 확립하였다. 유전 영동 기술은 분극을 통한 세포의 분리, 이동, 모으기, 특성연구 등에 많이 사용되는 방법으로서 경제적이고, 다루기 쉬운 방법이다. 덧붙여 유전영동 현상을일 이용하여 단일세포로 분리가능한 전극배열에서 분리된 세포들의 전기적특성연구를 진행하여 관측된 값으로부터 통계적으로 유의미한 데이터를 얻을 수 있도록 한다는 장점이 있다.
- [0005] 게다가 분극 지연이 매우 짧은 시간에 진행됨을 고려한다면, 분극의 방향을 빠르게 변화시킬 수 있는 시스템이 요구되는데, 유전영동 기술은 단순히 주파수를 빠르게 바꿔주면서 이를 가능하게 한다.
- [0006] 한편, 암세포 등 세포의 선별 및 분리 관련 선행기술로는, 초음파를 조사하였을 때의 정상 세포와 특이 세포의 감쇠 계수 (attenuation coefficient), 음속(speed of sound) 등의 차이를 이용하여, 정상 세포와 암 세포, 또는 정상 세포와 줄기 세포를 선별 및 분리하는 방법에 관한 기술이 개시되어 있으며, AFM 캔틸레버를 이용하여 순환종양세포 특이 단백질을 검지하는 방법 및 캔틸레버 기반의 생체물질 검출 시스템에 관한 것으로서, 0.5 nM 수준의 순환종양세포 특이 단백질을 고감도로 검지함으로써 암 조기진단을 실현할 수 있는 순환암세포 표적의 암 조기진단 분자진단기술이 개시되어 있고, 암진단용 바이오센서에 관한 것으로서, 구체적으로 펩타이드가 고정화된 에이에프엠 캔틸레버를 이용한 암세포 표지 단백질 분해효소의 효소활동성 측정방법에 관한 기술이 개시되어 있으며, 멀티오리피스 세그먼트를 갖는 MOFF 채널을 이용해 유체 수력학법으로 표적 입자를 분리 후, 유전영동법으로 재차 분리하는 입자 분리 장치 및 방법에 관한 것으로, 혈액과 같은 유체 샘플이 필터를 통해 이물질이 제거된 후 특정 세포, 예를들면 암세포와 같은 표적 입자를 MOFF 채널을 이용해 분리하고나서, 유전영동법으로 재차 분리하는 고효율 세포 분리 장치 및 방법에 관한 기술이 개시되어 있다.
- [0007] 그러나 간단한 분석과정을 통해 세포의 종류를 구분하고, 세포에 이상이 있는 경우 이를 검출할 수 있으며, 약물 처리시 세포에 미치는 영향을 판별할 수 있는 방법에 대해서는 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0983623호(2010.09.15)
 (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1765068호(2017.07.31)
 (특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1417506호(2014.07.02)
 (특허문헌 0004) 한국등록특허 제10-1269168호(2013.05.23)
 (특허문헌 0005) 한국등록특허 제10-0593792호(2006.06.20)
 (특허문헌 0006) 한국등록특허 제10-0838713호(2008.06.10)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 수득률이 높아 통계적으로 유의미한 데이터를 다량으로 축적할 수 있고, 주파수를 빠르게 바뀌주는 과정을 통해 매우 짧은 시간에 발생하는 분극 지연의 과정을 분석하여 세포의 종류와 특성을 분석할 수 있는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 세포막의 이상을 판단하는데 도움을 줄 수 있고, 약물의 효과를 판단하는데 사용될 수 있으며, 각각의 약물이 세포의 과도시간에 어느 정도 영향을 미치는 지를 판단함으로써 세포의 종류에 따른 약물의 성능 판단에도 도움이 될 수 있는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 목적은 세포 희석액을 양 끝 단에 파형 발생기가 구비된 미세 유체 칩에 개재하는 미세유체칩 개재단계, 상기 미세 유체 칩의 양 끝 단에 구비된 파형 발생기에 전압을 인가하는 전압 인가단계 및 상기 전압 인가단계를 통해 전압이 인가된 미세 유체 칩에 개재된 세포 희석액 내에 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 촬영하고 그레이스케일(grayscale)의 과도시간(transient time)을 통해 분석하는 세포움직임 분석단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법을 제공함에 의해 달성된다.

[0014] 본 발명의 바람직한 특징에 따르면, 상기 세포 희석액은 1 내지 100개/microliter의 농도로 버퍼에 희석되어 제조되는 것으로 한다.

[0015] 본 발명의 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 버퍼는 수크로오스, D-글루코스, 인산완충식염수 및 소혈청 알부민으로 이루어지는 것으로 한다.

[0016] 본 발명의 더욱 바람직한 특징에 따르면, 상기 세포는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa) 및 폐암 세포(Jurkat)로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것으로 한다.

[0017] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝 단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 1 내지 3Vp-p의 전압을 인가하되, 전압의 주파수를 0.5 내지 1.5kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 10 내지 500kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것으로 한다.

[0018] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 전압인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝 단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 2Vp-p의 전압을 인가하되, 전압의 주파수를 1kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 20 내지 200kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것으로 한다.

[0019] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 유전영동은 아래 수학적 식 1로 표기되는 것으로 한다.

[0020] [수학적 식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m\text{Re}[f_{CM}]\nabla|E_{rms}|^2$$

[0021]

[0022] 여기서 ϵ_0 는 진공상태의 유전상수이고,

[0023] ϵ_m 은 유체의 유전상수이며,

[0024] $\text{Re}[f_{CM}]$ 은 Clausius-Mossotti factor의 실수 값이고,

[0025] f_{CM} 은 입자와 입자를 둘러싼 유체의 상대적인 분극 능력을 나타내는 값이며,

[0026] E_{rms} 는 전기장의 실효값이다.

[0028] 또한, 본 발명의 목적은 이상 세포 희석액을 양 끝 단에 파형 발생기가 구비된 미세 유체 칩에 개재하는 미세유체칩 개재단계, 상기 미세 유체 칩의 양 끝 단에 구비된 파형 발생기에 전압을 인가하는 전압 인가단계, 상기 전압 인가단계를 통해 전압이 인가된 미세 유체 칩에 개재된 이상 세포 희석액 내에 이상 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 촬영하고 그레이스케일(grayscale)의 과도시간(transient time)을 통해 분석하는 세포

움직임 분석단계 및 상기 세포움직임 분석단계를 통해 분석된 데이터를 정상 세포의 데이터와 비교하는 데이터 비교 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출 방법을 제공함에 의해서도 달성될 수 있다.

[0029] 본 발명의 바람직한 특징에 따르면, 상기 이상 세포 희석액은 1 내지 100개/ μL 의 농도로 버퍼에 희석되어 제조되는 것으로 한다.

[0030] 본 발명의 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 버퍼는 수크로오스, D-글루코스, 인산완충식염수 및 소혈청 알부민으로 이루어지는 것으로 한다.

[0031] 본 발명의 더욱 바람직한 특징에 따르면, 상기 이상 세포는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa) 및 폐암 세포(Jurkat)로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것으로 한다.

[0032] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 1 내지 3Vp-p의 전압을 인가하되, 전압의 주파수를 0.5 내지 1.5kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 10 내지 500kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것으로 한다.

[0033] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 2Vp-p의 전압을 인가하되, 전압의 주파수를 1.0kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 20 내지 200kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것으로 한다.

[0034] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 유전영동은 아래 수학식 1로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 이상 세포의 검출방법:

[0035] [수학식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m\text{Re}[f_{CM}]\nabla|E_{rms}|^2$$

[0036]

여기서 ϵ_0 는 진공상태의 유전상수이고,

[0037]

ϵ_m 은 유체의 유전상수이며,

[0038]

$\text{Re}[f_{CM}]$ 은 Clausius-Mossotti factor의 실수 값이고,

[0039]

f_{CM} 은 입자와 입자를 둘러싼 유체의 상대적인 분극 능력을 나타내는 값이며,

[0040]

E_{rms} 전기장의 실효값이다.

[0041]

[0043] 또한, 본 발명의 목적은 이상 세포 희석액(대조군)과 약물로 처리된 이상 세포 희석액(실험군) 각각을 양 끝단에 파형 발생기가 구비된 미세 유체 칩에 각각 개재하는 미세유체칩 개재단계, 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 구비된 파형 발생기에 전압을 인가하는 전압 인가단계, 상기 전압 인가단계를 통해 전압이 인가된 미세 유체 칩에 개재된 대조군 내에 이상 세포의 움직임과 실험군 내에 이상 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 촬영하고 그레이스케일(grayscale)의 과도시간(transient time)을 통해 분석하는 세포움직임 분석단계 및 상기 세포움직임 분석단계를 통해 분석된 대조군의 데이터와 실험군의 데이터를 비교하는 데이터비교 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법을 제공함에 의해서도 달성될 수 있다.

[0044] 본 발명의 바람직한 특징에 따르면, 상기 이상 세포 희석액은 1 내지 100개/ μL 의 농도로 버퍼에 희석되어 제조되는 것으로 한다.

[0045] 본 발명의 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 버퍼는 수크로오스, D-글루코스, 인산완충식염수 및 소혈청 알부민으로 이루어지는 것으로 한다.

[0046] 본 발명의 더욱 바람직한 특징에 따르면, 상기 이상 세포는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa) 및 폐암 세포(Jurkat)로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것으로 한다.

[0047] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 약물은 이상 세포의 세포막 특성을 변화시키는 약물로 이루어

지는 것으로 한다.

[0048] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 약물은 Methyl-β-cyclodextrin으로 이루어지는 것으로 한다.

[0049] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 1 내지 3Vp-p의 전압을 인가하되, 전압의 주파수를 0.5 내지 1.5kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 10 내지 500kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것으로 한다.

[0050] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 전압 인가단계는 상기 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 2Vp-p의 전압을 인가하되, 전압의 주파수를 1.0kHz로 고정시킨 상태에서 전압을 인가한 후에, 전압의 주파수를 20 내지 200kHz로 변동시키는 과정으로 이루어지는 것으로 한다.

[0051] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 유전영동은 아래 수학식 1로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 약물처리 세포의 변화 검출방법:

[0052] [수학식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m \text{Re}[f_{CM}] \nabla |E_{rms}|^2$$

[0053]

여기서 ϵ_0 는 진공상태의 유전상수이고,

[0054]

ϵ_m 은 유체의 유전상수이며,

[0055]

$\text{Re}[f_{CM}]$ 은 Clausius-Mossotti factor의 실수 값이고,

[0056]

f_{CM} 은 입자와 입자를 둘러싼 유체의 상대적인 분극 능력을 나타내는 값이며,

[0057]

E_{rms} 전기장의 실효값이다.

[0058]

발명의 효과

[0060] 본 발명에 따른 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 세포 종류 구분 및 특성 분석법은 수득률이 높아 통계적으로 유의미한 데이터를 다량으로 축적할 수 있고, 주파수를 빠르게 바꿔주는 과정을 통해 매우 짧은 시간에 발생하는 분극 지연의 과정을 분석하여 세포의 종류와 특성을 분석할 수 있는 탁월한 효과를 나타낸다.

[0061] 또한, 세포막의 이상을 판단하는데 도움을 줄 수 있고, 약물의 효과를 판단하는데 사용될 수 있으며, 각각의 약물이 세포의 과도시간에 어느 정도 영향을 미치는지를 판단함으로써 세포의 종류에 따른 약물의 성능 판단에 도움이 되는 탁월한 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 주파수를 1kHz에서 20, 60, 100kHz로 바꿀 때 세포가 전극 위 원형구조물(윈도우:window)에 들어가는 데 걸리는 시간을 측정한 값을 나타낸 그래프이다.

도 2는 유방암 세포와 자궁 경부암 세포에 Methyl-β-cyclodextrin(MβCD) 라는 약물을 쳤을 때의 과도시간 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 유전영동을 이용한 주파수의 급격한 변화를 통한 암세포 종류 구분 및 특성 분석 과정을 나타낸 계략도이다.

도 4는 세포에 있어서 f_{CM} 의 그래프를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 실험 장치 내에서 전극의 일부구조를 유한요소해법을 적용하여 전기장분포 및 유전영동 힘의 방향을 나타낸 그래프이다.

도 6은 시간에 따른 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 찍었을 때의 사진을 주파수 별로 나타낸 것이다.

도 7은 주파수를 1kHz 시간에서 전극위 윈도우에 대한 평균 그레이스케일 값의 변화를 시간에 대하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 실험방법

[0065] 아래 도 3에 나타난 바와 같이, 암세포가 10개/microliter의 농도로 버퍼에 희석되어서 A번 그림과 같이 미세 유체 칩 위에 놓여졌다.

[0066] 이때, 상기 버퍼는 수크로오스, D-글루코스, 인산완충식염수 및 소혈청 알부민으로 이루어지는데, 8.6%(w/w) 수크로오스(sucrose), 0.3%(w/w) D-글루코스(D-glucose), 0.20%(v/v) 인산완충식염수{phosphate-buffered saline(PBS; 1)(Gibco) 및 1.0 mg/mL 소혈청 알부민(BSA, bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 이루어지는 것이 더욱 바람직하다.

[0067] 이후 C에서 보이는 것처럼, 미세 유체 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기(Function Generator)에 의해서 2Vp-p의 전압이 인가되었다. 그때 가해주는 전압의 주파수는 1kHz로 고정시키고 특정 시간 이후에 주파수를 20, 40, 60, 80, 100, 200 kHz로 갑자기 바꾸어 주었다. 이에 상응하는 세포의 위치는 아래 도 3의 D에 보이는 것처럼 1kHz에서는 음의 유전영동 힘을 받아서 전극위 주변보다 밝은 하얀색의 윈도우(window)의 중앙에 위치하게 되고, 바뀌는 주파수(20~200kHz)에서는 전극위 주변보다 밝은 하얀색 윈도우(window)에 붙잡히게 되는데, 이를 요약하여, 주파수를 갑자기 바꿔줄 때 세포의 움직임의 시작점을 시각적으로 표현한 것이 그림 B이다.

[0068] 세포가 이렇게 움직이는 원리는 유전영동에 기초하고 있다. 유전영동(dielectrophoresis)이란 극성을 띄지 않은 입자가 불균일한 교류 전기장에 노출될 때, 입자와 입자를 둘러싸고 있는 유체의 유전특성(전도도+유전율)에 의해서 입자가 힘을 받는 것을 의미한다. 이 때 입자는 외부 환경의 조건에 따라서 전기장의 구배가 큰 쪽 또는 작은 쪽으로 힘을 받게 되고 이를 각각 양의 유전영동, 음의 유전영동 이라고 한다. 유전영동의 이론적인 힘은 아래의 수학적 식 1을 따른다.

[0069] [수학적 식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m\text{Re}[f_{CM}]\nabla|E_{rms}|^2$$

[0070]

[0071] 상기 수학적 식 1에서 ϵ_0 , ϵ_m , $\text{Re}[f_{CM}]$, E_{rms} 는 각각 진공상태의 유전상수, 유체의 유전상수, Clausius-Mossotti factor의 실수 값, 전기장의 실효값을 나타낸다. f_{CM} 은 입자와 입자를 둘러싼 유체의 상대적인 분극 능력을 나타내는 값으로 주파수에 의존적이다. 세포에 있어서 f_{CM} 의 그래프는 아래 도 4에 나타난 바와 같다.

[0072] 아래 도 4에 나타난 것처럼, 로그 스케일의 주파수로 3.7 정도에서 $f_{CM} = 0$ 이 되는 것을 알 수 있다. $f_{CM} = 0$ 이 될 때의 주파수를 crossover frequency라고 정의하고 crossover frequency 보다 작은 주파수에서는 f_{CM} 이 음의 값을 가지고, 이후부터는 양의 값을 가진다.

[0073] 또한, 상기에 나타난 개념과 함께 실험 장치 내에서 전기장의 구배를 유한요소해법을 사용하는 시뮬레이션 프로그램(COMSOL)으로 확인하여 아래 도 5에 나타내었다.

[0074] 아래 도 5에 나타난 것처럼 전기장 구배는 전극 위 윈도우에서 가장 큰 전기장세기를 가지며, 전극 위 윈도우들이 대칭되는 지점에서 가장 작은 전기장 세기를 가진다. 1kHz의 음의 유전영동 상태에서는 전기장세기가 감소하는 방향으로 세포가 이동하려는 경향을 가지며, 양의 유전영동 상태에서는 전기장세기가 증가하는 방향으로 세포가 이동하려는 경향을 가진다(화살표의 방향).

[0075] 또한, 아래 도 6에는 시간에 따른 세포의 움직임을 전하 결합 소자(CCD) 카메라로 찍었을 때의 사진을 주파수 별로 나타내었는데, 0초에 주파수를 1kHz부터 각각의 주파수로 바꾸었다. 그림 A에서 바뀐 주파수에 따라서 세포가 전극 위 하얀색 윈도우로 들어가는데 까지 걸리는 시간(Transient time)이 다른 것을 알 수 있었다.

[0076] 상기와 같은 방법으로 세포의 움직임을 분석할 때, 그레이스케일 (grayscale)방법이 이용된다. 세포가 음의 유전영동 힘을 받고 있을 때, 세포들은 전극 위 윈도우들의 사이에 위치하여 있고 전극 위 윈도우는 상대적으로

밝은 그레이스케일을 띄게 된다. 이 때의 전극 위 윈도우 내 평균 그레이스케일을 분석한 값은 아래 도 7에 나타난 그래프로, 편차가 있지만 비교적 일정한 값 이내에서 평균 그레이스케일 값이 변하는 것을 알 수 있었다. 이렇게 일정한 값은 세포가 전극 위 윈도우를 향하면서 윈도우 안으로 들어오게 되면 세포의 색깔이 상대적으로 어둡기 때문에 전극 위 윈도우의 평균 그레이스케일이 떨어지게 된다. 이렇게 그레이스케일의 변화를 통해서 세포가 전극 위 윈도우에 들어왔다고 판단하고, 주파수를 바꿔준 시점으로부터 세포가 전극 위 윈도우에 들어와서 그레이스케일의 변화를 만들어 낼 때까지 걸린 시간을 과도시간(Transient time)이라고 정의한다.

[0078] **실험결과**

[0079] 아래 도 1은 20, 60, 100 kHz에서 각각 전극 위 윈도우에 들어가는 데 까지 걸리는 시간(Transient time)을 측정한 값이다. 오른쪽 그래프는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa), 폐암 세포(Jurkat)의 과도시간(Transient time)을 측정한 값을 비교한 사진이다. 세 종류의 세포의 과도시간의 평균이 다른 것을 알 수 있다. 이를 통해 세포를 분리해내는 인자로 사용할 수 있는 것을 확인하였다.

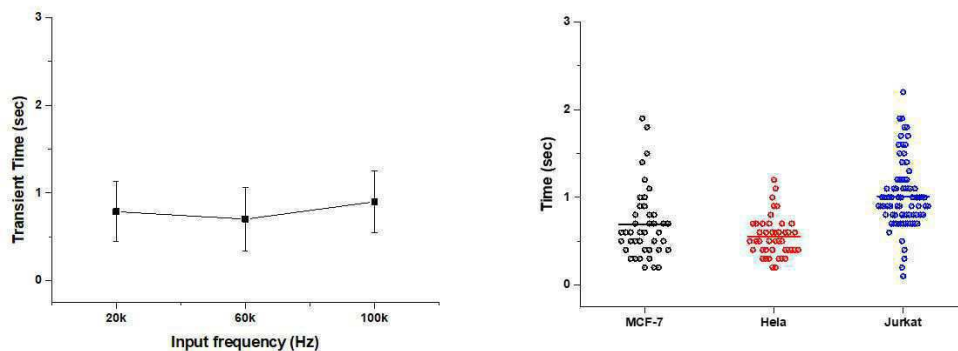
[0080] 또한, 아래 도 2는 유방암 세포와 자궁 경부암 세포에 Methyl- β -cyclodextrin(M β CD)라는 약물을 적용했을 때의 과도시간 결과를 나타낸 그래프이다.

[0081] M β CD 약물은 세포막의 특성을 변화시키는 약물로서, 이온에 대한 세포막의 투과성을 높인다. 이를 통해서 분극에 관련된 세포막의 능력에 변화가 일어나게 되고, 과도시간의 변화가 생긴다.

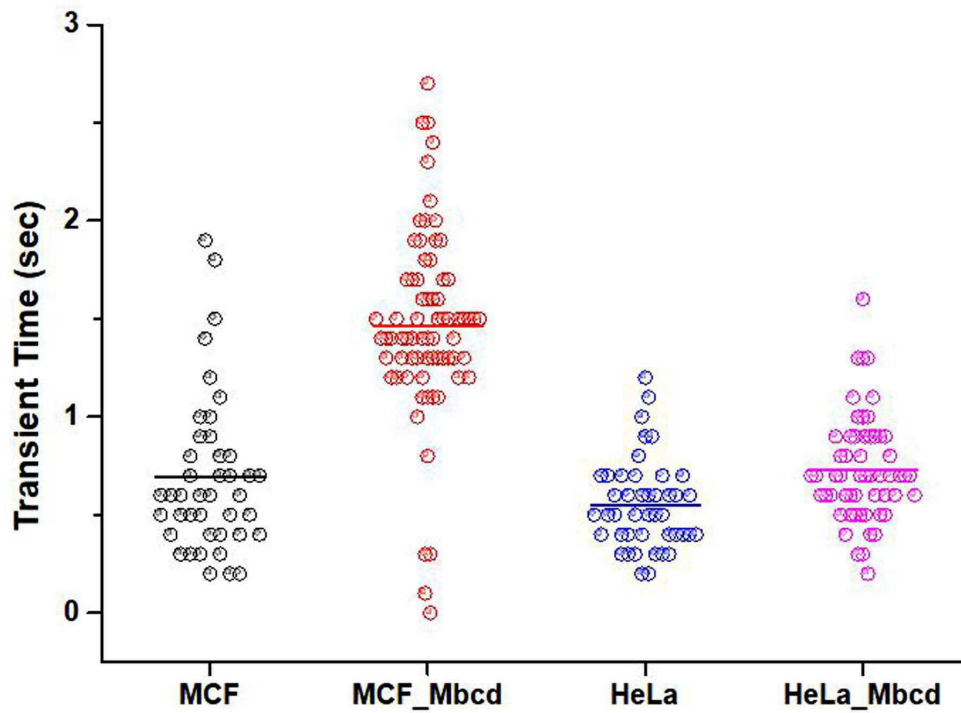
[0082] 따라서, 본 발명은 세포막의 이상을 판단하는데 도움을 줄 수 있고, 약물의 효과를 판단하는데 사용될 수 있으며, 각각의 약물이 세포의 과도시간에 어느 정도 영향을 미치는 지를 판단함으로써 세포의 종류에 따른 약물의 성능 판단에도 도움이 될 수 있다.

도면

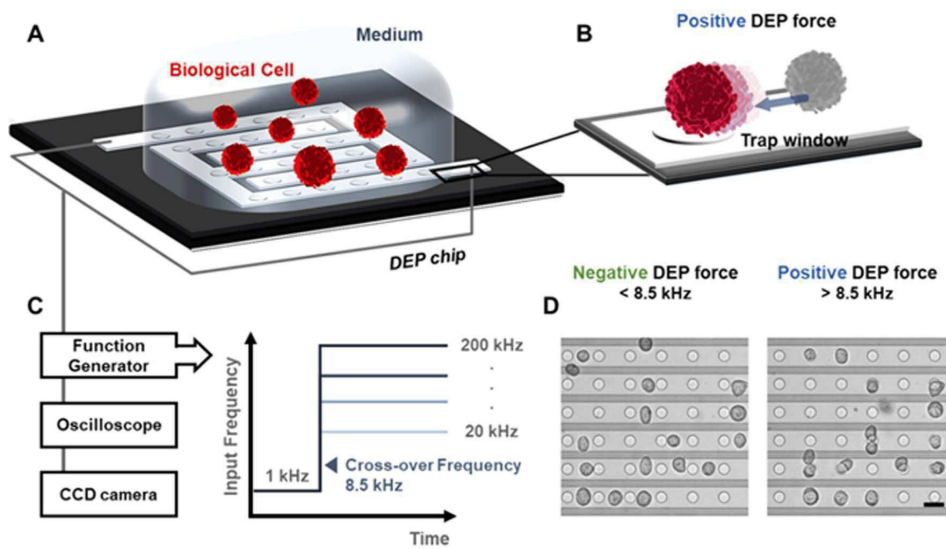
도면1



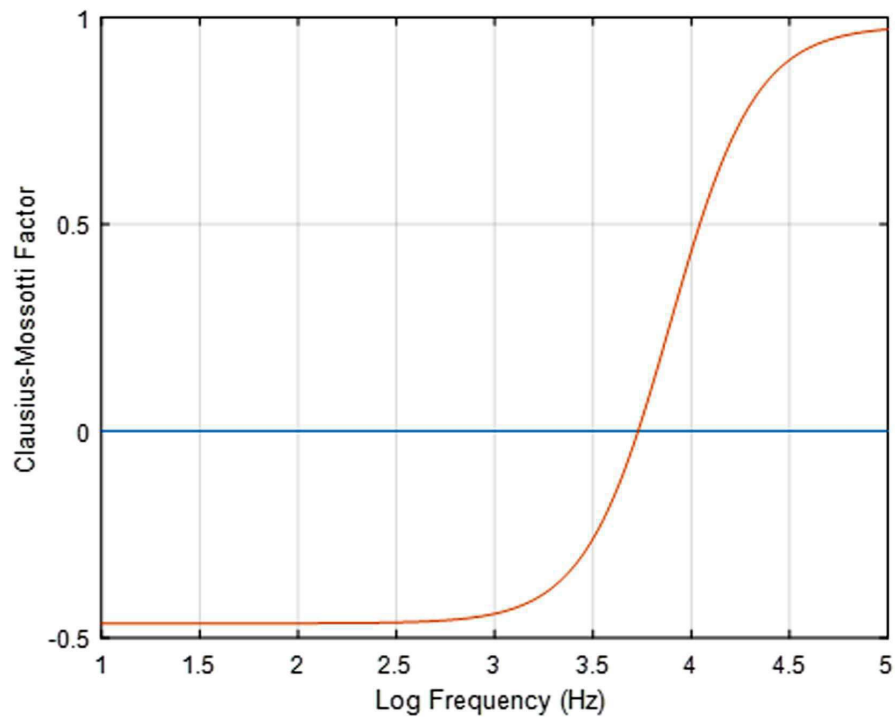
도면2



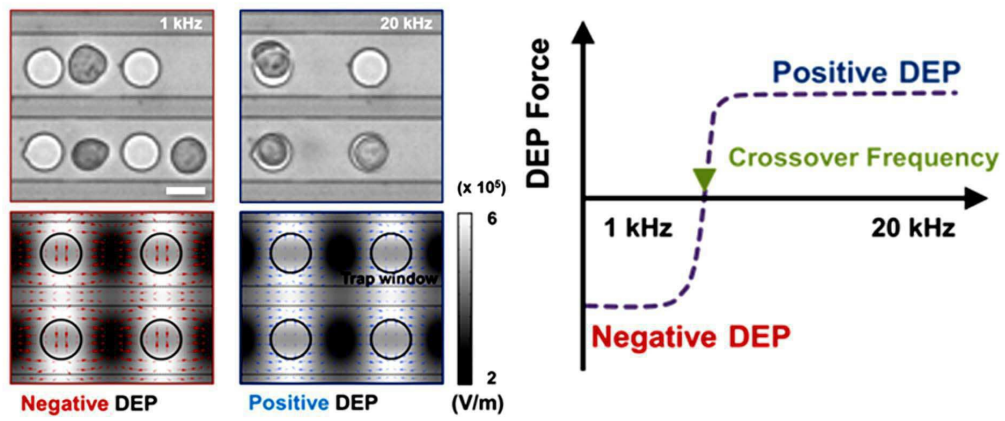
도면3



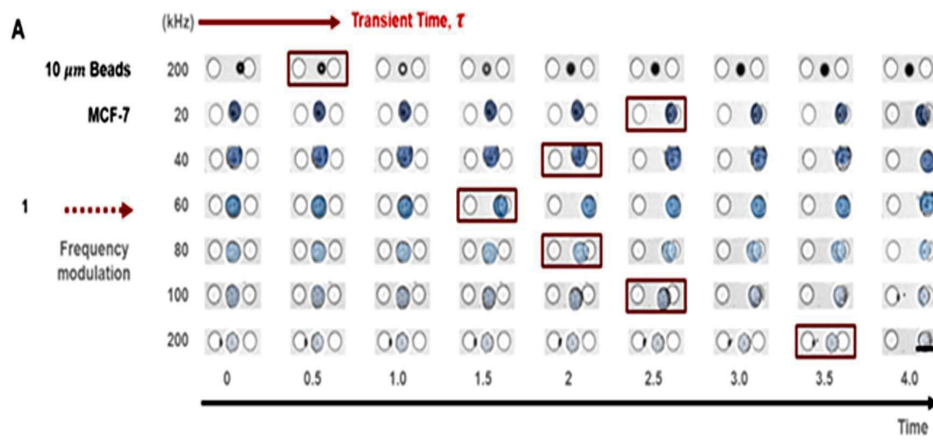
도면4



도면5



도면6



도면7

