	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2014-0098334 2014년08월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/50 (2006.01) G01N 35/08 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0010766 (22) 출원일자 2013년01월31일 심사청구일자 2014년02월04일	(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동) 주식회사 코젠바이오텍 서울특별시 금천구 가산디지털1로 168, C동 1203호 (가산동, 우림 라이온스밸리) (72) 발명자 정효일 서울 서초구 잠원로 150, 7동 206호 (잠원동, 잠원한신아파트) 현경아 인천 계양구 주부토로 581-1, (계산동) (74) 대리인 민혜정		

전체 청구항 수 : 총 14 항

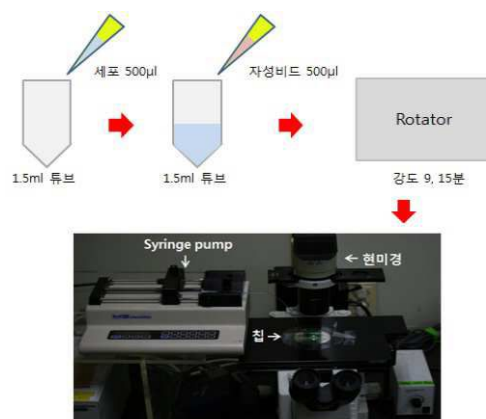
(54) 발명의 명칭 **자성비드와 광열효과를 이용한 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 장치 및 방법**

(57) 요약

본 발명은, 자성비드를 부착하여 순환종양세포의 크기를 증폭하고, 미세유체칩을 이용하여, 작은 크기의 혈구세포들은 통과시키고, 자성비드가 부착된 순환종양세포만을 포획하며, 포획된, 자성비드가 부착된 순환종양세포에서, 자성비드가 특정 파장의 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해, 세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되며, 추출된 바이오마커는 형광표지된 항체에 의해 확인되도록 이루어진, 자성비드와 광열효과를 이용한 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 장치 및 방법에 관한 것이다.

본 발명은, 순환종양세포 시료와 자성비드를 튜브에 넣어 교반하여, 자성비드를 순환종양세포에 부착하고, 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포함하는 순환종양세포 시료를, 다수의 공극을 가진 필터로 이루어진 미세유체칩을 통과시켜, 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포획하고, 포획된 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포함하는 미세유체칩으로, 레이저를 조사하며, 자성비드가 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해, 순환종양세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되고, 순환종양세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되어 있는 미세유체칩으로, 형광표지된 항체를 흘려주어, 바이오마커가 확인되도록 이루어진 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

정우상

경기 시흥시 대은로104번길 11, 102동 201호 (은행
동, 우남아파트)

남용석

경기 안양시 만안구 장내로120번길 11, 2동 1103호
(안양동, 벽산아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SA113226

부처명 중소기업청

연구사업명 중소기업기술혁신개발

연구과제명 체장 및 대장암 세포 분리용 마이크로 칩 개발

기 여 율 1/1

주관기관 코젠바이오텍

연구기간 2011.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

순환종양세포 시료와 자성비드를 튜브에 넣어 교반하여, 자성비드를 순환종양세포에 부착하고,

자성비드가 부착된 순환종양세포를 포함하는 순환종양세포 시료를, 다수의 공극을 가진 필터로 이루어진 미세유체칩을 통과시켜, 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포획하고,

포획된 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포함하는 미세유체칩으로, 레이저를 조사하며, 자성비드가 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해, 순환종양세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되는 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

순환종양세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되어 있는 미세유체칩으로, 형광표지 된 항체를 흘려주어, 바이오마커가 확인되도록 이루어진 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

형광표지 된 항체를 흘려진 미세유체칩을 형광 현미경을 이용하여 형광 사진을 찍어 형광 강도(intensity)를 측정하는 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

순환종양세포 시료와 자성비드를 튜브에 넣어 교반하여, 자성비드를 순환종양세포에 부착시, 15분 동안 교반하는 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

순환종양세포 시료와 자성비드를 튜브에 넣어 교반하여, 자성비드를 순환종양세포에 부착시, 순환종양세포와 자성비드의 부피의 비는 1:1로 하는 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

순환종양세포는 유방암 세포(MCF-7)인 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 자성비드는 EpCAM항체가 코팅된 자성비드인 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

미세유체칩은 2개의 필터로 이루어지되, 하나의 필터는 공극 직경이 15 μ m로 이루어지며, 다른 하나의 필터는 공극 직경이 8 μ m로 이루어진 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

필터는 70% 알코올을 통해 채널을 소독하고, 1% BSA가 들어간 PBS를 통과 시켜 필터 표면처리를 행하는 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 자성비드는 철성분을 함유한 자성비드인 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

레이저는 532nm파장을 가지는 레이저인 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 12

제3항에 있어서,

형광 사진에서 형광 강도(intensity)가 감소여부를 통해 바이오마커가 추출여부를 확인하는 것을 특징으로 하는, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법으로 포획된 순환종양세포.

청구항 14

제2항 내지 제3항 중 어느 하나의, 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법으로 추출된 바이오마커.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 자성비드를 부착하여 순환종양세포의 크기를 증폭하고, 미세유체칩을 이용하여, 작은 크기의 혈구세포들은 통과시키고, 자성비드가 부착된 순환종양세포만을 포획하며, 포획된, 자성비드가 부착된 순환종양세포에서, 자성비드가 특정 파장의 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해, 세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되며, 추출된 바이오마커는 형광표지된 항체에 의해 확인되도록 이루어진, 자성비드와 광열효과를 이용한 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 순환종양세포(circulating tumor cells, CTCs)는 원발암에서 떨어져 나와 인체를 순환하는 암세포이다. 그 수가 매우 적고, 헤테로지니어스(heterogeneous)한 특성때문에 아직 많은 연구가 필요한 분야이다.

[0003] 기존의 연구는 분석방법과 과정이 복잡하고, 고가의 장비들이 필요로 하는 경우가 많았다. 또한 분석 단계마다, 순환종양세포의 손실이 있기 때문에, 어려움이 많았다.

[0004] 최근들어, 미세유체칩을 이용한 다양한 분석방법들이 제안되고 있다. 이와같이, 미세유체칩을 이용하면, 빠르고

간단하며, 적은 양의 샘플로도 분석이 가능하며, 또한, 값싸고 크지 않은 장비들을 이용하기 때문에 어디서든 어렵지 않게 진단 및 분석이 가능하다. 그러나, 순환종양세포는 그 크기가 작으므로 미세유체칩을 사용하기 어려운 점이 있다.

[0005] 특히, 최근들어, 크기가 백혈구와 비슷한 순환종양세포도 존재한다고 알려졌고, 기존의 크기 기반으로 분리하는 방법에는 이렇듯 크기가 작은 순환종양세포를 분리할 수 없는 한계가 있다.

[0006] 따라서 본 발명은 자성비드를 부착하여 순환종양세포의 크기를 증폭하고, 미세유체칩을 이용하여, 작은 크기의 혈구세포들은 통과시키고, 자성비드가 부착된 순환종양세포만 포획하고, 포획된, 자성비드가 부착된 순환종양세포에서, 자성비드가 특정 파장의 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되며, 추출된 바이오마커는 형광표지된 항체에 의해 확인되는, 자성비드와 광열효과를 이용한 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 장치 및 방법을 제안한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 자성비드를 부착하여 순환종양세포의 크기를 증폭하고, 미세유체칩을 이용하여, 작은 크기의 혈구세포들은 통과시키고, 자성비드가 부착된 순환종양세포만을 포획하여, 포획된, 자성비드가 부착된 순환종양세포에서, 자성비드가 특정 파장의 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되며, 추출된 바이오마커는 형광표지된 항체에 의해 확인되는, 자성비드와 광열효과를 이용한 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 장치 및 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법은, 순환종양세포 시료와 자성비드를 튜브에 넣어 교반하여, 자성비드를 순환종양세포에 부착하고, 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포함하는 순환종양세포 시료를, 다수의 공극을 가진 필터로 이루어진 미세유체칩을 통과시켜, 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포획하고, 포획된 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포함하는 미세유체칩으로, 레이저를 조사하며, 자성비드가 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해, 순환종양세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되는 것을 특징으로 한다.

[0009] 순환종양세포가 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되어 있는 미세유체칩으로, 형광표지된 항체를 흘려주어, 바이오마커가 확인되도록 이루어지며, 형광표지된 항체를 흘려진 미세유체칩을 형광 현미경을 이용하여 형광 사진을 찍어 형광 강도(intensity)를 측정한다.

[0010] 순환종양세포 시료와 자성비드를 튜브에 넣어 교반하여, 자성비드를 순환종양세포에 부착시, 15분 동안 교반하며, 순환종양세포와 자성비드의 부피의 비는 1:1로 한다.

[0011] 순환종양세포는 유방암 세포(MCF-7)이며, 자성비드는 EpCAM항체가 코팅된 자성비드이다.

[0012] 미세유체칩은 2개의 필터로 이루어지며, 하나의 필터는 공극 직경이 15 μm 로 이루어지며, 다른 하나의 필터는 공극 직경이 8 μm 로 이루어진다.

[0013] 필터는 70% 알코올을 통해 채널을 소독하고, 1% BSA가 들어간 PBS를 통과 시켜 필터 표면처리를 행하여 진다.

[0014] 자성비드는 철성분을 함유한 자성비드이고, 레이저는 532nm파장을 가지는 레이저이다.

[0015] 형광 사진에서 형광 강도(intensity)가 감소여부를 통해 바이오마커가 추출여부를 확인한다.

[0016] 또한, 본 발명은 본 발명의 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법으로 포획된 순환종양세포를 특징으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 본 발명의 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 방법으로 추출된 바이오마커를 특징으로 한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 의하면, 미세유체칩을 이용하여, 작은 크기의 혈구세포들은 통과시키고, 자성비드가 부착된 순환종양세포만 포획하고, 포획된, 자성비드가 부착된 순환종양세포에서, 자성비드가 특정 파장의 레이저를 흡수하여 내

는 열에 의해 용해(lysis)되어 바이오마커가 추출되며, 추출된 바이오마커는 형광표지된 항체에 의해 확인되는, 자성비드와 광열효과를 이용한 순환종양세포의 포획 및 바이오마커의 추출을 위한 장치 및 방법을 제공한다.

[0019] 특히, 본 발명은 순환종양세포의 포획을 위해 미세유체칩을 이용함으로써, 빠르고 간단하며, 적은 양의 샘플로도 분석이 가능하며, 또한, 값싸고 크지 않은 장치들을 이용하기 때문에 어디서든 어렵지 않게 진단 및 분석이 가능하다.

[0020] 본 발명은, 순환종양세포에 특이적으로 존재하는 상피세포부착분자(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 항체가 표지된 자성비드를 순환종양세포에 부착하여, 크기가 큰 순환종양세포 뿐만 아니라 크기가 작은 순환종양세포도 증폭되어 필터를 이용해 포획 할 수 있다. 또한 532nm의 파장을 흡수하여 광열효과를 발생시키는 자성비드를 사용함으로써 EpCAM 항체와 특이적으로 반응한 순환종양세포의 막을 광열효과를 이용하여 효과적으로 용해시킬 수 있다. 막이 제거된 순환종양세포에서 나오는 바이오마커를 형광 표지된 항체를 이용하여 확인하고, 형광의 정도에 따라 그 농도를 정량할 수 있다.

[0021] 본 발명은, 순환종양세포 분자 분석을 통한 항암제 감수성 평가를 할 수 있으며, 단일세포(single cell) 단위로 순환종양세포 내의 바이오 마커를 확인함으로써 매우 다양한 특성을 갖는 순환종양세포를 하나하나 그 특징을 분석할 수 있으며, 신약 개발에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명에서 교반기를 이용하여 자성비드를 순환종양세포에 부착하는 상태를 나타내는 도면이다.

도 2는 MCF-7과 자성비드의 부착을 위한 교반시간에 따른 부착된 비드의 개수를 나타낸다.

도 3은 MCF-7에 자성비드의 부착시, MCF-7과 자성비드의 농도 비율에 따른 부착된 비드의 개수를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 필터인 미세유체칩의 일예이다

도 5는 본 발명에서 순환종양세포만 포획을 설명하기위한 설명도이다.

도 6은 본 발명에서 레이저를 조사하여 세포를 용해시키기 위한 시스템을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예들에 따른 장치 및 상기 장치의 제조 방법에 대하여 상세하게 설명하지만, 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0024] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예들에 따른 장치 및 장치 제조방법을 상세하게 설명한다.

[0025] <자성비드의 부착>

[0026] 본 발명에서 자성비드와 순환종양세포의 바인딩(binding) 방법은 다음과 같다.

[0027] 1) 원하는 농도비율로 세포와 자성비드를 준비한다.

[0028] 2) 1.5ml 튜브에 순환종양세포와 자성비드 각각 500 μ l씩 넣는다.

[0029] 3) 교반기(rotator)에 튜브를 고정시킨 후 최적화된 시간(15분)동안 교반한다.

[0030] 4) 튜브안에서 MCF-7의 EpCAM항원과 자성비드의 EpCAM항체가 항원-항체반응으로 결합되게 된다. 경우에 따라서는 이를 현미경으로 확인할 수 있다.

[0031] 도 1은 본 발명에서 교반기를 이용하여 자성비드를 순환종양세포에 부착하는 상태를 나타내는 도면이다.

[0032] 본 발명에서는 자성비드를 순환종양세포에 부착하기 위해서, 튜브(에펜도르프 튜브)에 자성비드와 순환종양세포를 넣은 후, 상기 튜브를 교반기(rotator)에 장착하고, 교반기로 15분간 강도 9(강도가 1 내지 10의 강도를 정하도록 이루어진 교반기에서 강도 9를 나타냄)로 교반하여, 순환종양세포에 자성비드를 부착시킨다.

[0033] 자성비드는 시판용 자성비드로, 상피세포부착분자(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 항체가 표지된

자성비드를 사용할 수 있다. 본 발명에서는 EpCAM 코팅된 자성비드를 사용하나, 경우에 따라서는 EpCAM 코팅되지 않은 자성비드를 후술하는 방법에 의해 자성비드에 EpCAM 코팅을 행하여 사용할 수 있다. 자성비드로 철성분의 자성비드 또는 금성분의 자성비드 등을 사용할 수 있다.

- [0034] 순환종양세포로는 유방암 세포(MCF-7)가 적용될 수 있다. MCF-7은 EpCAM을 발현하는 순환종양세포로, 자성비드가 MCF-7에 붙기 위해서는 자성비드에 EpCAM항체가 존재해야한다. 세포와 적절한 비율의 농도를 맞추고 교반기로 자성비드를 부착시킨다.
- [0035] MCF-7은 수 많은 순환종양세포 중 한 종류로, 본 발명은 MCF-7 뿐만 아니라 EpCAM을 발현하는 모든 순환종양세포에 적용이 가능하다. 또한 자성비드에 EpCAM이 아닌 다른 항원에 반응하는 항체 등을 붙인다면 순환종양세포가 아닌 다양한 종류의 세포에도 적용이 가능하다. 즉, 본 발명은, MCF-7가 아닌 순환종양세포라 하더라도, 자성비드를 부착하고, 필터(미세유체칩)로 포획하여 532nm파장의 레이저를 조사하여 바이오마커를 확인할 수 있다.
- [0036] 도 2는 MCF-7과 자성비드의 부착을 위한 교반시간에 따른 부착된 비드의 개수를 나타낸다.
- [0037] 순환종양세포에 자성비드를 부착하기 위해 효율적 교반시간을 검출하기 위한 실험으로서, 1.5ml 에펜도르프 튜브 안에 세포와 자성비드를 각각 500 μ l씩 넣었다. 농도는 세포와 자성비드의 비율이 1:1000($4 \times 10^4 : 4 \times 10^7$)이 되게 하여 실험을 진행하였다. 교반기를 이용하여 1, 5, 10, 15, 20분 동안 교반시켜 자성비드를 부착시킨 결과, 15분에서 높은 효율(13.51개)을 나타내고 있음을 알 수 있다.
- [0038] 도 3은 MCF-7에 자성비드의 부착시, MCF-7과 자성비드의 농도 비율에 따른 부착된 비드의 개수를 나타낸다.
- [0039] 순환종양세포에 자성비드를 부착하기 위해, 순환종양세포와 자성비드의 교반시, 순환종양세포와 자성비드의 최적의 농도비율을 찾는 실험을 진행하였다.
- [0040] 도 2에서와 같이 최적의 교반시간(최적화한 부착시간)인 15분동안, 순환종양세포와 자성비드의 농도비율이 각각 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000에서 부착되는 자성비드의 개수를 확인하였다. 그 결과, 도 3에서와 같이, 1:500 이상에서 높은 결과(12.24개)를 나타내었다. 도 3에서, 1:500과 1:1000의 결과가 비슷하지만 자성비드의 소모량을 줄이기 위하여 1:500의 농도비율이 채택되었다.
- [0041]
- [0042] <순환종양세포 포획>
- [0043] 자성비드가 부착된 순환종양세포는 그 크기가 증폭되게 되며, 필터인 미세유체칩을 통과시키면, 작은 크기의 혈구세포들은 통과되고, 증폭된 순환종양세포만 포획되게 된다.
- [0044] 본 발명의 필터인 미세유체칩은 공극을 가지는 일반적으로 사용되는 디자인의 필터로, 세포의 크기에 따라서 큰 세포는 필터에 붙잡히고 작은 세포는 통과하게 되도록 이루어진다.
- [0045] 일반적으로, 적혈구의 경우는 7~8 μ m의 크기를 갖기 때문에 10~25 μ m정도의 크기를 갖는 순환종양세포와는 확실히 분리가 가능하다. 그러나 백혈구의 경우는 8~20 μ m의 크기이기 때문에 크기만을 이용하여 순환종양세포와 분리하는 것은 어렵다.
- [0046] 따라서 본 발명은 자성비드를 붙임으로써 순환종양세포의 크기를 증폭시키고, 백혈구와 크기의 차이를 둠으로써 필터를 이용하여 분리가 가능하게 된다. 순환종양세포를 분석하기 위해서 순수하게 순환종양세포만 분리하는 것이 중요하기 때문에 크기차이를 이용하여 분리가 가능한 필터를 이용하였다.
- [0047] 본 발명에서는 필터인 미세유체칩을 2개 적용할 수 있으며, 하나의 필터는 공극 직경이 15 μ m로 이루어지며, 다른 하나의 필터는 8 μ m로 이루어질 수 있다.
- [0048] 도 4는 본 발명의 필터인 미세유체칩의 일예로, 도 4의 (a)는 공극 직경이 15 μ m인 필터이고, 도 4의 (b)는 공극 직경이 8 μ m인 필터이다
- [0049] 일반적으로 백혈구는 약 8~20 μ m의 크기를 갖고, 순환종양세포의 경우 14~25 μ m의 크기를 갖는다. 그러나 백혈구의 경우는 세포의 형태가 쉽게 변화하여 (high deformability) 좁은 필터 간격도 통과할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 순환종양세포의 경우 4 μ m 비드로 코팅되어 크기가 4~8 μ m가량 증폭되기 때문에 크기의 분포가 최소 18~29 μ m (최대 22~33 μ m)로 증폭되어 1차적으로 15 μ m간격에 붙잡히고, 변형을 일으켜 통과하더라도 8 μ m간

격에서 포획되게 된다.

- [0051] 본 발명의 필터는 세포 실험을 하기 위해서 표면처리를 행한다. 표면처리는 세포가 죽을 수 있는 소수성의 환경을 친수성으로 바꿔주는 것으로, 70%알코올을 통해 채널을 소독하고, 1% BSA가 들어간 PBS를 통해 칩 표면에 비특이적 반응에 의한 세포가 달라붙지 않고 채널이 막히지 않게 한다. 이 과정은 다음과 같다.
- [0052] 1) 70%알코올 500 μ l를 시린지 펌프(syringe pump)를 이용하여 5분간 주입한다.
- [0053] 2) 1% BSA가 들어간 PBS 1ml를 시린지 펌프(syringe pump)를 이용하여 30분간 주입한다.
- [0054] 도 5는 본 발명에서 순환종양세포만 포획을 설명하기위한 설명도이다. 도 5 중의 사진은 표면처리와 자성비드가 붙은 MCF-7을 필터로 걸러내기 위한 시스템을 나타낸다.
- [0055] 필터로 세포를 포획(capture)을 위해, 자성비드가 결합된 MCF-7은 15, 8 μ m의 직경의 공극을 가지는 필터로 걸러지게 되며, 그 과정은 다음과 같다.
- [0056] 1) 회수율을 계산하기 위해 자성비드가 결합된 MCF-7의 농도를 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 계산한다.
- [0057] 2) 표면처리 된 칩에 시린지 펌프(syringe pump)를 이용하여 자성비드가 결합된 MCF-7을 주입한다. 이때, 빠른 유속에서는 자성비드가 결합된 MCF-7도 변형을 하여 좁은 간격의 필터도 통과할 수 있기 때문에 낮은 유속에서 행한다.
- [0058] 3) 현미경을 통해서 필터에 걸린 세포를 확인한다.
- [0059] <바이오마커 추출>
- [0060] 필터인 미세유체칩으로부터 포획된, 자성비드가 부착된 순환종양세포에 532nm파장의 레이저를 조사하면, 자성비드의 광열효과, 즉, 자성비드가 532nm파장의 레이저를 흡수하여 내는 열에 의해, 순환종양세포가 용해(lysis)되고 바이오마커가 추출되게 된다.
- [0061] 일반적으로 레이저를 조사하였을 때 흡수하여 열을 내는 물질이면 광열효과를 발휘하게 된다. 주로 금 나노입자(gold nanoparticles)(나노로드, nanorods)가 사용된다. 예를들어 금 나노로드(gold nanorods)는 그 종횡비(aspect ratio)에 따라서 흡수하는 레이저 파장이 다르다. 그 금 나노로드가 흡수하는 파장의 레이저를 조사하면 레이저를 흡수하여 광열효과에 의해 열을 발산하게 되고, 그 열에 의해 세포를 용해시킬 수 있다.
- [0062] 금(gold) 대신 철(Fe)성분을 이용하여 광열효과를 나타낼 수 있다. 철 성분은 532nm파장의 레이저를 흡수하고 열을 발산한다. 철 성분으로 이루어진 자성비드를 사용하여, 단지 크기를 증폭하기 위해서 비드를 붙이는 것이라면 폴리스티렌 비드를 사용해도 상관없지만, 532nm파장의 레이저를 흡수하여 열을 내기 위해서는 폴리스티렌 비드를 사용할 수 없다. 결국 자성비드의 철 성분이 레이저를 흡수하여 열을 발산함으로써 온도가 상승하게 되고, 높아진 온도에 의해 자성비드에 붙어있는 순환종양세포가 용해된다. 용해되어 죽으면서 세포가 터지게 되고, 터진 부분을 통해 세포 안에 있던 바이오마커들이 추출되게 된다.
- [0063] 즉, 532nm파장의 레이저를 흡수하는 것은 철(Fe)성분으로, 자성비드로 철 성분의 자성비드를 사용하여, 순환종양세포에 부착하고, 상기 자성비드가 부착된 순환종양세포를 포획하고, 포획된 순환종양세포에 532nm 파장의 레이저를 조사하면, 상기 자성비드 성분인 철이 레이저를 흡수하여 온도가 상승하게 되고, 높아진 온도 때문에 붙어있는 순환종양세포가 죽게 되며, 죽으면서 순환종양세포가 터지게 되고 터진 부분을 통해 내부에 있던 바이오마커들이 나오게 된다. 순환종양세포가 용해된 후, 바이오마커는 자성비드, 필터, 세포 등에 묻쳐있게 된 상태로, 필터인 미세유체칩 상에 놓여있게 된다. 형광표지 된 항체를 미세유체칩을 통해 흘려주어 각각의 자리에서 바이오마커의 확인이 가능하게 된다.
- [0064] 추출된 바이오마커는 기본적으로 육안을 통해 확인되나 이를 정량하기 위해서는 각각의 세포에 대해 형광 현미경을 이용하여 형광 사진을 찍고 형광 강도(intensity)를 측정하여 정량화한다.
- [0065] 형광세포를 이용하여 세포가 용해되었을 때, 세포내의 형광물질이 추출되면서 세포의 형광이 줄어드는 것을 현미경을 통해 사진을 찍고, 형광 강도(intensity)가 감소됨을 통해 바이오마커가 추출됨을 확인할 수 있다.
- [0066] 도 6은 본 발명에서 레이저를 조사하여 세포를 용해시키기 위한 시스템을 나타낸다.
- [0067] 레이저 조사장치의 밑에는 자성비드가 부착된 순환종양세포가 포획된 미세유체칩이 위치되고, 레이저 조사장치

의 전원 스위치가 온(ON)되면, 레이저 조사장치로부터 레이저가 조사되도록 이루어진다. 이때 조사되는 레이저는 레이저 파워측정장치로 측정되어 표시된다.

[0068] 본 발명에서는 레이저를 조사하여 바이오마커의 추출하는 과정은, 필터에 532nm파장의 레이저를 조사하여 세포를 용해시키고, 자성비드가 레이저를 흡수하여 열을 내면 세포가 용해되면서 터지게 되고 내부에 있던 단백질들이 빠져나오게 되어, 레이저를 조사하여 세포를 용해시킨 후, 세포 내부에 있는 단백질과 반응하는 형광을 띄는 항체를 넣어주게 되면 빠져나온 단백질과 반응하여 형광을 띄게 된다. 이 형광을 띄는 사진을 찍어서 바이오마커가 추출된 것을 확인할 수 있다.

[0069] 또는 형광을 띄는 세포를 사용하여, 레이저를 조사하고 용해시킨 후 형광의 밝기가 줄어드는 것을 확인함으로써 세포 내부에 있던 형광물질이 추출된 것을 확인할 수 있다.

[0070] <자성비드에 EpCAM 코팅방법>

[0071] 본 발명에서는 자성비드에 EpCAM항체가 코팅이 되어 있어야 만이 EpCAM을 발현하는 MCF-7과 결합을 할 수 있다. 상용화된 자성비드 중에 EpCAM항체가 코팅된 비드를 사용한다면 따로 자성비드에 EpCAM항체를 코팅할 필요 없이 사용하면 된다. 하지만 EpCAM항체가 코팅되어있지 않은 자성비드라면 따로 코팅하는 작업을 수행해야하며, 그 순서는 다음과 같다.

[0072] 1) 500 μ l의 자성비드를 1.5ml 튜브에 넣고 30초 정도 와동(vortexing)시킨다.

[0073] 2) 자성비드용액에 0.02%의 트윈20(polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate, tween20) 1ml을 추가한 후 와동(vortexing)시킨다.

[0074] 3) 원심분리기에서, 2분간 8000rpm으로 원심분리(centrifuge) 시킨 후 soup 를 제거한다.

[0075] 4) 0.02%의 트윈20 1ml을 자성비드 용액에 넣고 상기 3)의 과정을 수행하되, 이러한 4)의 과정을 2번 반복한다.

[0076] 5) MES 버퍼 1ml 넣고 2분간 8000rpm으로 원심분리기(centrifuge)에서 돌린 후 soup를 제거한다.

[0077] 6) 상기 5)에 EDC/NHS (Ethylenedichloride/N-Hydroxysuccinimide) 각각의 stock을 500 μ l씩 분주한다.

[0078] 7) Protein G stock에 450 μ l MES 버퍼를 넣고 상기 5)에 첨가한다.

[0079] 8) 상기 5)를 1시간 30분 동안 교반(rotation)한 후 원심분리기(centrifuge)로 2분간 8000rpm으로 돌린 후 상층액을 버린다.

[0080] 9) 0.02%의 트윈20 1ml를 넣은 후, 2분간 8000rpm으로 원심분리기(centrifuge)로 돌리고 상층액을 제거하되, 이를 2번 반복한다.

[0081] 10) PBS 1ml 넣은 후, 2분간 8000rpm으로 원심분리기(centrifuge)를 돌리고 상층액을 제거한다.

[0082] 11) 50 μ l씩 분주된 EpCAM에 200 μ l의 PBS를 넣고 이것을 상기 10)에 첨가 후, 와동(vortexing) 시킨다. 그 후 1 내지 1시간반 동안 교반(rotation)한다.

[0083] 12) 상기 9), 10)의 과정을 반복하며, 잔여 antibody를 제거한다.

[0084] 13) 5% BSA를 1ml 넣고 1시간 동안 교반(rotation)한다.

[0085] 14) 2분간 8000rpm에서 원심분리기(centrifuge)를 돌리고 soup를 제거한다.

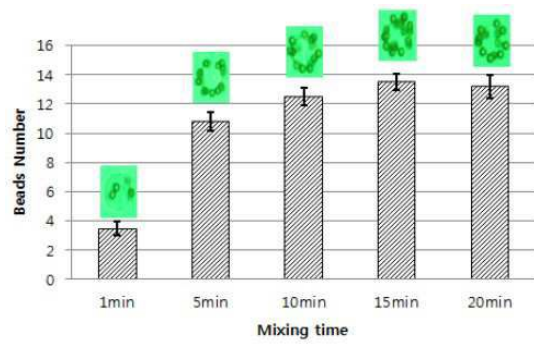
[0086] 15) 1% BSA 500 μ l를 넣고 suspension시킨 후 4도에서 보관한다. 이는 1달 사용 가능하다.

도면

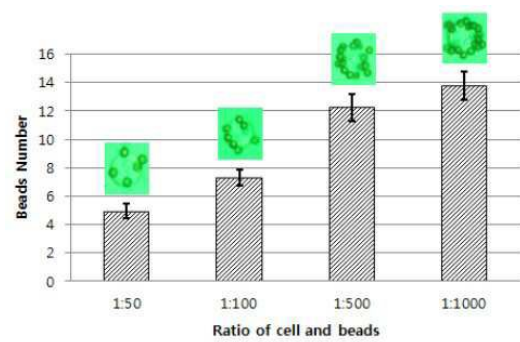
도면1



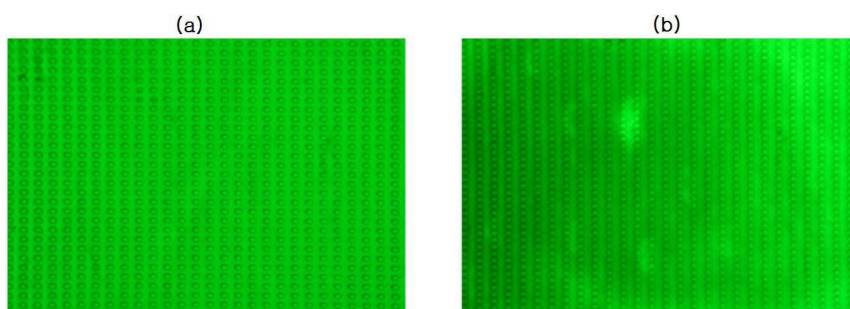
도면2



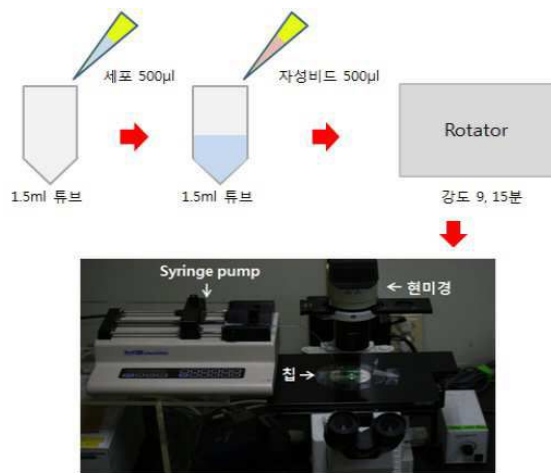
도면3



도면4



도면5



도면6

