



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0100565
(43) 공개일자 2009년09월24일

(51) Int. Cl.

G01N 35/00 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0025825

(22) 출원일자 2008년03월20일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

정형일

서울 은평구 신사2동 368 대주파크빌아파트
101-1005

김성규

서울 송파구 방이1동 대림아파트 5-301

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 11 항

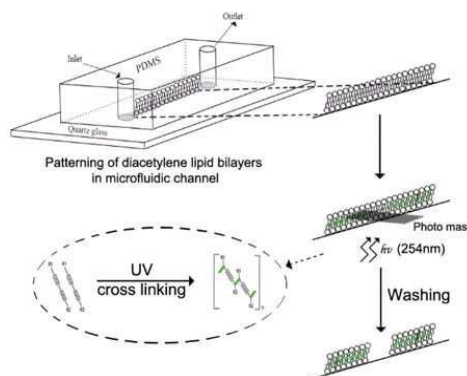
(54) 미소유체도관 내에서 강제된 소포체 융합을 이용한 이중지질층의 형성 및 이를 이용한 미세패턴의 제조방법, 및 상기 미세패턴을 포함하는 생체칩

(57) 요약

본 발명은 미소유체도관 내에서 강제된 소포체 융합을 이용한 이중지질층의 형성 및 이를 이용한 미세패턴의 제조방법, 및 상기 미세패턴을 포함하는 생체칩에 관한 것이다.

보다 상세하게는, 본 발명은 미소유체도관 내에서 지질 소포체의 융합을 강제함으로써 고체 지지체 상에 이중지질층 혹은 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 형성하는 방법, 상기 SPB의 광중합을 유도하여 미세패턴을 제조하는 방법, 및 상기로부터 제작된 패턴을 포함하여 세포 등의 생체분자물질에 대해 친화적인 환경을 제공함과 동시에 생체 내의 반응을 모식할 수 있고, 나아가 신경세포 축색의 신장방향을 제어할 수 있는 생체칩에 관한 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1030500041

부처명 산업자원부

연구사업명 시스템 직접 반도체 기술개발

연구과제명 CMOS 정보보안 모듈 CMOS 뉴런칩 SOC

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2007년 09월 01일 ~ 2008년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

0.34 내지 1.66 dyne/cm²인 압력 범위에서 10분 내지 15분 동안 지질 소포체를 고체 지지체에 강제 융합시키는 것을 특징으로 하는 미소유체도관 내에서 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

지질이 디아세틸렌계 지질인 것을 특징으로 하는 미소유체도관 내에서 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제조하는 방법.

청구항 3

제1항에 따라 제조된 SPB(substrate supported planar lipid bilayer).

청구항 4

제1항에 따른 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제조하는 제1단계;

부분적 광조사에 의해 상기 SPB의 광융합 반응을 유도하는 제2단계; 및

광융합 반응 후 미반응 잔여 지질을 제거하여 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴을 제조하는 제3단계를 포함하는 미소유체도관 내에서 미세패턴의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

미반응 지질은 알코올 또는 1% SDS를 포함하는 증류수를 0.4 내지 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유입 속도로 20분 이상 주입하여 제거하는 것을 특징으로 하는 미소유체도관 내에서 미세패턴의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴을 주형으로 하여, 광융합이 가능한 지질 소포체를 0.34 내지 1.66 dyne/cm²인 압력 범위에서 10분 내지 15분 동안 미소유체도관에 주입하여 상기 미세패턴의 지질이중층이 제거된 영역의 고체 지지체 상에 강제 융합시켜 SPB를 형성하는 단계를 더 포함하는 미소유체도관 내에서 미세패턴의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

광융합이 가능한 지질 소포체는 생체물질 또는 상기 생체물질을 부착하기 위한 유도물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 미소유체도관 내에서 미세패턴의 제조방법.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따라 제조된 미세패턴.

청구항 9

제8항의 미세패턴이 내부에 장착된 하나 이상의 미소유체도관을 포함하는 생체칩.

청구항 10

제9항에 있어서,

미세패턴에 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) 또는 신경세포 중 어느 하나를 고정시키는 것을 특징으로 하는 생체칩.

청구항 11

제9항에 있어서,

신경세포 축색의 신장방향을 제어할 수 있는 칩인 것을 특징으로 하는 생체칩.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 미소유체도관 내에서 강제된 소포체 융합을 이용한 이중지질층의 형성 및 이를 이용한 미세패턴의 제조방법, 및 상기 미세패턴을 포함하는 생체칩에 관한 것이다.
- <2> 보다 상세하게는, 본 발명은 미소유체도관 내에서 지질 소포체의 융합을 강제함으로써 고체 지지체 상에 이중지질층 혹은 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 형성하는 방법, 상기 SPB의 광중합을 유도하여 미세패턴을 제조하는 방법, 및 상기로부터 제작된 패턴을 포함하여 세포 등의 생체분자물질에 대해 친화적인 환경을 제공함과 동시에 생체 내의 반응을 모식할 수 있고, 나아가 신경세포 축색의 신장방향을 제어할 수 있는 생체칩에 관한 것이다.

배경 기술

- <3> 마이크로·나노 기술은 현재 의료 및 생명공학 분야 시장에서의 활용을 위해 이 두 기술 분야를 접목시키고자 하는 노력이 계속되고 있다. 이러한 융합 기술 중 대표적인 것이 미소유체도관(microfluidic channel)을 포함하는 시스템이다. 미소유체도관 시스템은 특히 생명공학 및 의료 분야의 기술을 마이크로미터 이하의 크기에서 재현함으로써 고효율의 HTS (High Throughput Screening)이나 휴대 가능한 이동진단기술을 실현할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 이 미소유체도관 내에 세포나 단백질 등 생체물질을 고정화 하는 기술의 발전 수준이 충분하지 못하여 이러한 마이크로·나노 기술과 의료 및 생명공학 분야 기술의 접목의 진전 또한 지체되고 있다. 이를 위해, 위한, 미소유체도관 내에 세포나 단백질 등 생체물질을 고정화 하는 기술의 발전이 미비한 실정이다.
- <4> 이러한 미소유체도관 기술과 생체물질의 고정화 기술을 접목을 위한 방법의 하나로, 이중지질층을 이용해 생체물질의 고정화 및 분석, 이용하는 방법이 있다. 이중지질층을 이용한 연구를 위해서 우선, 지질을 이용한 이중지질층의 제작하는 기술이나 이중지질층에 패턴을 제작하는 기술 혹은 이중지질층 자체를 이용하여 패턴을 제작하는 기술들이 개발되고 발전하여 왔다. 이에 더하여, 이러한 미소유체도관 내의 패턴을 이용하여 생체물질에 관한 연구를 하기 위해 미소유체도관을 생체 물질에 관한 연구에 사용하는 기술이나 미소유체도관 내부를 생체물질에 적합하게 처리하는 기술들 또한 개발되고 발전하여 왔다.
- <5> 그러나, 미소유체도관 내에 미세패턴을 제작하는 문제점, 사전에 제작된 미세패턴을 미소유체도관의 위치에 맞춰 정렬시키는 문제점 및 고체 지지체 상에 존재하는 미세패턴을 포함하는 층으로 인해 미소유체도관 형성을 위한 PDMS 등으로 만들어진 칩 각 층의 접합이 방해되는 문제점 등은 아직 해결되지 않고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <6> 본 발명의 목적은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 미소유체도관 내에서 지질 소포체를 고체 지지체에 강제 융합시켜 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- <7> 본 발명의 다른 목적은 상기 SPB를 이용하여 미소유체도관 내에서 미세패턴을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- <8> 본 발명의 또 다른 목적은 지질 소포체를 이용한 상기의 미세패턴이 내부 장착되어 생체물질에 대해 친화적 환경이 형성된 미소유체도관을 포함하는 시스템을 제공하는 것이다.
- <9> 본 발명의 또 다른 목적은 N-CAM 등의 세포부착도움물질을 포함한 미세패턴을 제작하여 신경세포의 고정 및 생

존화를 확립하고, 이로부터 신경세포 축색의 신장방향을 제어할 수 있는 생체칩을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <10> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 0.34 내지 1.66 dyne/cm²인 압력 범위에서 10분 내지 15분 동안 지질 소포체를 고체 지지체에 강제 융합시키는 것을 특징으로 하는 미소유체도관 내에서 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제조하는 방법을 제공한다.
- <11> 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제공한다.
- <12> 본 발명은 또한
- <13> 본 발명의 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제조하는 제1단계;
- <14> 부분적 광조사에 의해 상기 SPB의 광중합 반응을 유도하는 제2단계; 및
- <15> 광중합 반응 후 미반응 잔여 지질을 제거하여 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴을 제조하는 제3단계를 포함하는 미소유체도관 내에서 미세패턴의 제조방법을 제공한다.
- <16> 상기 미소유체도관 내에서 미세패턴의 제조방법은 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴을 주형으로 하여, 광중합이 가능한 지질 소포체를 0.34 내지 1.66 dyne/cm²인 압력 범위에서 10분 내지 15분 동안 미소유체도관에 주입하여 상기 미세패턴의 지질이중층이 제거된 영역의 고체 지지체 상에 강제 융합시켜 SPB를 형성하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <17> 본 발명은 또한 본 발명의 미소유체도관 내에서 미세패턴의 제조방법에 따라 제조된 미세패턴을 제공한다.
- <18> 본 발명은 또한 본 발명의 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴 또는 상기 미세패턴을 주형으로 하여, 상기 지질이중층이 제거된 영역의 고체 지지체 상에 새로운 지질 소포체가 강제 융합되어 있는 미세패턴이 내부에 장착된 하나 이상의 미소유체도관을 포함하는 생체칩을 제공한다.

효과

- <19> 본 발명에 따르면, 미소유체도관 내에서 고체 지지체 상에 형성된 이중지질층 혹은 SPB(substrate supported planar lipid bilayer), 상기 층을 이용한 미세패턴의 제작을 통해, 제작된 패턴이 생체분자물질에 대해 친화적인 환경을 제공할 뿐 아니라 생체 내의 반응을 모식할 수 있어, 세포부착도움물질을 포함하는 미세패턴에 신경세포를 고정하여 신경세포 축색의 신장방향을 제어할 수 있는 생체칩을 제공하는 효과가 있다.
- <20> 또한, 본 발명에 따르면, 미소유체도관을 이용하는 생체칩을 제작하는 공정에 있어서, 미소유체도관을 설치 혹은 부착하기 이전에 고체 지지체 상에 우선적으로 특정 패턴을 제작하거나 부착하는 과정과 이러한 패턴의 위치를 미소유체도관과 정밀하게 정렬하여 부착하는 과정을 생략하여 전체 공정을 단순화시키는 장점이 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <21> 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- <22> 본 발명은 0.34 내지 1.66 dyne/cm²인 압력 범위에서 10분 내지 15분 동안 지질 소포체를 고체 지지체에 강제 융합시키는 것을 특징으로 하는 미소유체도관 내에서 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- <23> 상기 지질은 지질이중층 형성이 가능하고, 광중합이 가능한 지질이라면 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 디아세틸렌계 지질인 것이 좋다.
- <24> 상기 디아세틸렌계 지질로는, 1,2-di-10,12-tricosadiynoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DTPC), 1,2-di-10,12-tricosadiynoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(DTPE), 또는 1-palmitoyl-2,10,12-tricosadiynoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(PTPE) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- <25> 상기 지질 소포체는 미소유체도관 내에서 SPB(substrate supported planar lipid bilayer) 형성을 분석하기 위해, 형광물질을 추가로 포함할 수 있다.
- <26> 상기 형광물질은 형광발색을 하는 염료라면 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는, 로다민, Texas Red, 이소

티오시아네이트(FITC), 오레곤 그린(Oregon Green), 퍼시픽 블루(Pacific Blue), R-피코에리트린, 로돌 그린(Rhodol Green), 쿠마린 유도체, 또는 아미노 메틸 쿠마린 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

- <27> 또한, 상기 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)는 지질 소포체를 일정 압력범위에서 미소유체도관으로 주입하여 제조하는 것이 바람직하다.
- <28> 상기 압력은 미소유체도관의 크기에 따라 조절되므로 특별히 제한하지는 않으나, 미소유체도관의 높이가 170 내지 180 μ m, 폭이 100내지 500 μ m일 경우, 0.34 내지 1.66 dyne/cm²인 압력 범위에서 10분 내지 15분 동안 주입하는 것이 바람직하다. 상기 압력 범위에서는 이러한 지질 소포체의 파쇄 및 부착이 이루어지지 않고, 적정 속도를 초과하는 경우에는 지질 소포체의 부착 후에 다시 탈락이 일어나게 된다. 즉, 지질용액을 적정 속도 미만으로 주입한 경우, FRAP(fluorescence recovery after photobleaching) 관찰에서 해당 영역의 형광이 관찰되지 않음을 통해 SPB가 형성되지 않음을 확인할 수 있으며, 지질용액을 적정 속도를 초과하여 주입한 경우, 형광에 의한 관찰에서 지질층이 제대로 형성되지 않음을 확인할 수 있다.
- <29> 상기 고체 지지체는 형성된 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)의 광중합 반응을 유도하기에 적합하도록 광(UV) 투과율이 80% 이상인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 고체 지지체는 실리콘 웨이퍼 또는 석영유리인 것이 좋다.
- <30> 상기 미소유체도관은 투광성과 탄력성, 생물학적 안정성 및 화학적 안정성을 갖는 고분자 화합물이라면 특별히 제한하지는 않으나, 폴리디메틸실록산(PDMS, polydimethylsiloxane), 폴리메틸(메타)아크릴레이트(PMMA, polymethyl-methacrylate), 폴리알킬실록산 (poly(alkylsiloxane)), 폴리(메타)아크릴레이트 (poly(meth)acrylate), 폴리알킬(메타)아크릴레이트 (polyalkyl(meth)acrylates), 폴리카보네이트(polycarbonates), 폴리사이클릭올레핀 (polycyclic olefins), 폴리이미드(polyimides), 또는 폴리우레탄(polyurethanes) 등을 단독 또는 2종 이상 사용하여 제조하는 것이 바람직하다.
- <31> 상기 재질로 제조된 미소유체도관 틀과 실리콘 웨이퍼 또는 석영유리로 된 기판의 접합방법은 특별히 제한하지는 않으나, 각각 플라즈마 세정처리하여 표면을 활성화시킨 후 접합하는 것이 바람직하다.
- <32> 상기 지질 소포체의 유입 속도를 조절하여 제조하는 본 발명의 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)의 제조방법은 도 1에 간략하게 도시하였으며, 다음의 단계별로 구체적으로 설명한다.
- <33> 제1단계: SUV(small unilamellar vesicle) 지질 소포체의 제조
- <34> 지질로 사용하는 diynePC는 클로로포름에 녹인 후 질소가스를 이용해 진공 건조시켜 지질층 케이크를 제조한다.
- <35> 상기 지질층 케이크를 탈기(degas)된 PBS(phosphate buffered saline) 용액(diacetylene-containing phospholipid)에서 녹인 다음, 반복적인 동결/해동 과정을 수행한다.
- <36> 상기 동결/해동 과정은 -60℃ 내지 -80℃에서 10분 내지 1시간 동안 동결한 후, 70℃ 내지 90℃에서 10분 내지 1시간 동안 해동시키는 과정을 한 번의 사이클로 하며, 이 과정을 6 내지 8 사이클 반복한다.
- <37> 용해된 지질 케이크 용액을 50nm 기공을 갖는 막을 필터로 사용하는 압출기(extruder)를 1회 내지 수회 통과시킴으로써, 지질 소포체의 크기가 100nm 내지 200nm인 작고 균일한 SUV(small unilamellar vesicle) 상태가 되도록 한다.
- <38> 상기 압출 과정은 지질의 전이온도(transition temperature)보다 높은 온도에서 수행해야 SUV의 형성이 제대로 이루어진다. 상기 온도는 지질에 종류에 따라 다양하므로 특별히 제한하지는 않는다.
- <39> 상기 과정을 통해 제작한 SUV 용액은 4℃에서 1주일 간 보관 및 사용이 가능하다.
- <40> FRAP(fluorescence recovery after photobleaching) 분석을 위해 지질 용액에 지질 농도 대비 0.5 내지 2 mol%의 Texas Red DHPE(Molecular Probes, USA)를 첨가하는 것이 바람직하다.
- <41> 제2단계: 미소유체도관 내에서 SPB 형성
- <42> 상기 SUV 지질 소포체 용액은 실린지 펌프(syringe pump)를 이용하여 미소유체도관 내로 주입하고, 지질 소포체의 주입 속도에 의한 압력 조절을 통해, 지질 소포체의 파쇄 및 부착을 통한 고정화를 유도하여 고체 지지체에 강제 융합시켜 SPB를 형성한다.
- <43> 상기 SPB 형성 후에는, 0.3 내지 0.7 μ l/min의 주입 속도로 10 내지 30분간 탈이온수를 주입하여 여분의 지질 소

포체 등을 제거한다.

- <44> 본 발명은 또한 상기 SPB(substrate supported planar lipid bilayer) 제조방법에 따라 제조된 SPB에 관한 것이다.
- <45> 본 발명의 SPB는 지질 소포체가 고체 지지체 상에 강제 융합되어 지질이중층을 형성하고 있는 상태로, 세포, 수용체, 또는 세포막 채널 구조체 등의 생체분자물질에 대해 친화적인 환경을 제공하고, 생체 내의 반응을 모식할 수 있는 여건을 조성하는 특징이 있다.
- <46> 본 발명은 또한
- <47> 본 발명의 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 제조하는 제1단계;
- <48> 부분적 광조사에 의해 상기 SPB의 광중합 반응을 유도하는 제2단계; 및
- <49> 광중합 반응 후 미반응 잔여 지질을 제거하여 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴을 제조하는 제3단계를 포함하는 미소유체도판 내에서 미세패턴의 제조방법에 관한 것이다.
- <50> 본 발명의 미소유체도판 내에 제작한 SPB에 대해, 광식각(photolithography) 방법을 이용하여 패턴을 제작하는 것이 바람직하다. 즉, 광식각 공정에서 사용하는 포토마스크(photomask)를 이용하여 부분적인 UV광 조사를 함으로써 SPB의 일부를 견고한 중합체 구조로 만들고, 중합되지 않은 부분을 제거하여 일부 영역이 지질이중층이 제거되고 고체 지지체로만 되어 있는 패턴을 제조하는 것이다.
- <51> 상기 지질로 광중합이 가능한 디아세틸렌계 지질을 사용하는 것이 바람직하며, 상기 지질에 포함된 디아세틸렌 부분은 UV광 조사에 의해 해당 디아세틸렌 단위체 내부의 이중결합이 끊어지면서 근방의 끊어진 이중결합과 중합함으로써 견고한 중합체를 형성하게 된다.
- <52> 상기 지질의 광중합을 위한 자외선광의 파장은 254nm이 바람직하고, 자외선광의 투과성을 높이기 위해 미소유체도판과 접합하는 고체 지지체로서 실리콘 웨이퍼, 또는 석영유리 기판을 사용하는 것이 좋다. 즉, 상기 미소유체도판 내에 SPB를 만든 후 석영유리 기판을 투과하여 포토마스크를 통한 자외선광 조사를 실시하는 것이 좋다. 포토마스크를 이용한 부분적 광조사를 통해 SPB의 일부 영역에서 광중합 반응이 유도되지 않는다.
- <53> 상기 광중합이 일어나지 않은 SPB는 알코올, 보다 바람직하게는, 에탄올 또는 1% SDS를 포함하는 증류수를 0.4 내지 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유입 속도로 20분 이상 주입하여 제거하는 것이 바람직하나, 상기 용매의 유입 속도 및 시간은 당업자 수준에서 얼마든지 변형이 가능하므로 이에 특별히 제한하지는 않는다.
- <54> 본 발명의 미세패턴의 제조방법에 따라 제조된 미세패턴은 본 발명의 SPB에 대한 광조사 시 포토마스크에 의해 마스크되어 지질이중층의 광중합이 일어나지 않은 부분을 포함하고 있어, 세정과정에서 지질이중층이 제거됨으로써 고체 지지체만 노출된 일부 영역을 포함하도록 고안된 미세패턴이다.
- <55> 또한, 본 발명의 미세패턴 제조방법은 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴을 주형으로 하여,
- <56> 광중합이 가능한 지질 소포체를 0.34 내지 1.66 dyne/cm^2 인 압력 범위에서 10분 내지 15분 동안 미소유체도판에 주입하여 상기 미세패턴의 지질이중층이 제거된 영역의 고체 지지체 상에 강제 융합시켜 SPB를 형성하는 단계를 더 포함하여 미세패턴을 제조할 수 있다.
- <57> 상기 주형 미세패턴에 있어서, 지질이중층이 제거된 일부 영역에 새로운 이중지질층을 형성하기 위한 지질 물질로는 광중합이 가능한 지질이라면 특별히 제한하지는 않으나, 주형 미세패턴을 제조하는 데 사용하는 지질과 상변이 온도가 다른 지질을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 상기 지질은 상기 주형 미세패턴을 형성하는 지질의 상변이 온도보다 낮은 것이 좋다. 상기 상변이 온도는 5℃ 이상 차이가 나는 것이 좋다.
- <58> 상기 주형 미세패턴을 형성하는 지질은 상변이 온도가 -20℃ 내지 40℃인 것이 바람직하다.
- <59> 상기 주형 미세패턴의 지질이중층이 제거된 영역에 형성되는 새로운 SPB는 본 발명의 SPB 제조와 동일한 방법에 따라 형성된다.
- <60> 또한, 상기 새로운 SPB 형성 후, 여분의 지질 소포체 등을 제거하기 위해서 실온에서 탈이온수로 20분 내지 1시간 세정하는 것이 바람직하다.
- <61> 또한, 상기 지질 소포체는 생체물질을 추가로 포함하여 주형 미세패턴에서 지질이중층이 제거된 영역에 새로운 SPB를 형성할 수 있다. 상기 생체물질로 막단백질, 세포막 수용체, 채널구조체 또는 세포, 예를 들어 혈관내피

세포 (HUVEC; human umbilical vein endothelial cell) 또는 신경세포 등을 사용할 수 있다.

- <62> 또한, 상기 미세패턴은 상기 생체물질, 특히 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) 또는 신경세포의 고정 및 생존을 확보를 위해 생체물질을 부착하기 위한 유도물질을 추가로 포함하여 제작될 수 있다.
- <63> 상기 생체물질을 부착하기 위한 유도물질로 NCAM (neural cell adhesion molecule)이나 FGF (fibroblast growth factor), NGF (nerve growth factor), Neurotrophin-3 또는 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- <64> 본 발명의 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴을 주형으로 하여, 상기 지질이중층이 제거된 고체 지지체 상에 생체물질을 포함하는 지질 소포체가 강제 융합되어 있는 미세패턴은 미소유체도관 내에 장착되어 생체물질에 친화적인 환경을 제공할 수 있다.
- <65> 본 발명은 또한 본 발명의 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴 또는 상기 미세패턴을 주형으로 하여, 상기 지질이중층이 제거된 영역의 고체 지지체 상에 새로운 지질 소포체가 강제 융합되어 있는 미세패턴이 내부에 장착된 하나 이상의 미소유체도관을 포함하는 미소유체도관 시스템에 관한 것이다.
- <66> 상기 미소유체도관 시스템 또는 생체칩은 지질이중층을 포함하고 있어 생체분자물질에 대한 친화적인 환경을 제공함과 동시에 생체 내 반응을 모식할 수 있다.
- <67> 본 발명은 또한 본 발명의 일부 영역이 지질이중층이 제거된 미세패턴 또는 상기 미세패턴을 주형으로 하여, 상기 지질이중층이 제거된 영역의 고체 지지체 상에 새로운 지질 소포체가 강제 융합되어 있는 미세패턴이 내부에 장착된 하나 이상의 미소유체도관을 포함하는 생체칩에 관한 것이다.
- <68> 상기 생체칩은 생체물질, 예를 들어 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell), 또는 신경세포의 고정 및 생존을 확보를 위해 미세패턴 제작 시 생체물질을 부착하기 위한 유도물질을 추가하여 제작할 수 있다.
- <69> 따라서, 상기 생체칩은 신경세포가 고정되어 신경세포 축색의 신장방향을 제어할 수 있는 칩인 것을 특징으로 한다.
- <70> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <71> <실시예 1> 미소유체도관 내에서 지질 소포체의 고체 지지체에 대한 강제적인 융합에 의한 SPB 제작
- <72> 고체 지지체 상에 SPB를 제작하기 위해, 석영유리(quartz glass) 기판을 준비하였다. 상기 석영유리 기판은 황산(H_2SO_4) 70%와 과산화수소(H_2O_2) 30%로 이루어진 피라냐 용액(piranha solution)에 담가 초음파세정기에서 1시간 동안 세정하였다. 세정한 유리 기판은 탈이온수로 세정한 후, 필터를 거친 질소 가스로 건조시켰다.
- <73> 미소유체도관은 PDMS(polydimethylsiloxane)를 이용하여 제조하였다. PDMS로 만든 미소유체도관과 석영유리 기판은 각각 플라즈마 세정처리를 하여 표면을 활성화시킨 후 접합하였다. 상기 미소유체도관 형상의 경우, 높이는 이러한 미소유체도관을 만들기 위한 주형을 만들 때 상용되는 SU8-2050의 경우에 맞춘 것이고, 폭은 각각 100 μm , 200 μm , 500 μm 으로 하였다.
- <74> SPB를 제조하기 위해, UV광 조사를 통해 광중합 반응을 일으킬 수 있는 diynePC(1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-sn-glycero-3-phospho-choline)을 이용하였다.
- <75> 지질로 사용하는 diynePC는 클로로포름에 녹인 후 이를 질소 가스를 이용해 건조시켰다. 질소 가스는 클로로포름을 증발시킨 후 이를 보다 확실히 건조시켜 지질층의 막(lipid film)으로 이루어진 케이크(cake)를 형성하기 위해 테시케이터에 넣고 진공 상태에서 6시간 동안 건조시켰다. 만들어진 지질층 케이크는 탈기(degas)된 PBS(phosphate buffered saline) 용액(diacetylene-containing phospholipid)를 이용해 녹이게 되며, 이는 상기에서 지질층 케이크와 탈기 PBS용액을 섞은 후 분쇄(vortexing) 과정을 1시간 수행함으로써 이루어진다. 분쇄 과정이 끝난 지질용액은 용액 내의 지질 케이크가 완전히 녹는 것을 돕기 위해 반복적인 동결/해동 과정을 수행하였다. 즉, -70℃에서 30분간 동결한 후, 80℃에서 30분간 해동시키는 과정을 한 번의 사이클로 하며, 이 과정을 7 사이클 반복하였다. 이러한 동결 및 해동 과정을 통해 지질케이크가 용해된 용액은, 60℃에서, 50nm 기공을 갖는 막을 필터로 사용하는 압출기(extruder)를 수차례 통과시킴으로써 지질소포체의 크기가 150nm내지 200nm인 작고 균일한 SUV(small unilamellar vesicle) 상태가 되도록 하였다.
- <76> 상기로부터 제작한 SUV 용액은 4℃에서 1주일 간 보관 및 사용이 가능하다.

- <77> FRAP(fluorescence recovery after photobleaching) 분석을 위해, 상기 SUV 용액에 지질 농도 대비 1 mol%의 Texas Red DHPE(Molecular Probes,USA)를 첨가하였다.
- <78> 상기 지질 용액을 미소유체도관 내로 주입하는 것은 실린지 펌프(syringe pump)를 사용하였다. 이 미소유체도관의 높이는 165 μ m, 폭은 100 μ m이고, 이때의 주입 속도는 0.1 μ l/min, 주입 시간은 10분으로 하였다.
- <79> 다음으로, SPB를 형성한 후에는, 0.5 μ l/min의 주입속도로 20분간 탈이온수를 주입하여 여분의 지질 소포체를 제거하였다.
- <80> 상기 SPB의 형성 기작은 도 1에 도시하였다.
- <81> <실시예 2> 미소유체도관 내의 SPB에 대한 부분적인 광조사를 통한 미세패턴의 제작
- <82> 상기 실시예 1에 따라 미소유체도관 내에 제작한 SPB에 대해, 광식각(photolithography) 방법을 이용하여 패턴을 제작하였다. 이는 광식각 공정에서 사용하는 포토마스크(photomask)를 이용하여 부분적인 UV광 조사를 함으로써 SPB의 일부를 견고한 중합체 구조로 만들고, 중합되지 않은 부분을 제거하여 패턴 영역으로서의 차별성을 갖게 만드는 방법이다. 상기 실시예 1에서 제조한 SPB에 대해, 석영유리 기판을 투과하여 광마스크를 통해 UV광 조사를 수행하였다. 이때, 자외선 파장은 254nm로 하였다.
- <83> 다음으로, 광 조사 후, 중합되지 않은 SPB 부분은 에탄올을 주입하여 제거한 후 탈이온수로 세정하였다.
- <84> 이로부터 형성되는 미세패턴의 제조과정은 도 2에 간략히 도시하였다.
- <85> <실시예 3> 실시예 2의 미세패턴을 주형으로 하여, 새로운 SPB가 삽입된 미세패턴의 제작
- <86> 상기 실시예 2에 따른 미세패턴을 주형으로 하고, 상기 미세패턴 내 고체 지지체만 노출된 부분에 새로운 SPB를 삽입시킨 미세패턴을 제작하였다.
- <87> 상기 실시예 2의 미세패턴 내부의 고체 지지체가 노출된 부분에 새로운 이중지질층을 형성하기 위한 지질 물질로서 eggPC를 사용했다.
- <88> eggPC를 이용한 새로운 SPB 형성은 실시예 1과 동일한 방법으로 실시하였다. 이때, eggPC의 유입 속도는 5 μ l/min로 하여 10분 동안 미소유체도관에 주입하였다.
- <89> 상기 eggPC가 견고한 diynePC 구조물 내부의 부영역에 차별적인 SPB층을 형성한 후, 여분의 eggPC 지질 소포체는 실온에서 탈이온수로 30분간 세정하여 제거하였다.
- <90> 상기 미세패턴의 제조과정은 도 3에 간략히 도시하였고, 도 4는 광중합하는 지질 물질의 모식도를, 도 5는 형광 관찰 결과를 나타내었다.
- <91> <실시예 4> 실시예 3의 새로운 SPB층에 생체물질을 삽입하여, 미소유체도관 내 미세패턴의 제작
- <92> 상기 실시예 2에 따른 미세패턴을 주형으로 하고, 상기 미세패턴 내 고체 지지체만 노출된 부분에 세포 친화 물질을 포함하는 지질소포체를 삽입시킨 미세패턴을 제작하였다.
- <93> 상기 실시예 2의 미세패턴 내부의 고체 지지체가 노출된 부분에 새로운 이중지질층을 형성하기 위한 지질 물질로서는 상기 실시예 3의 eggPC 지질 소포체에 세포 부착 도움 물질인 N-CAM 을 포함시켜 새로운 지질 소포체를 만들어 사용하였다.
- <94> 새로운 지질소포체를 이용한 새로운 SPB 형성은 실시예 1과 동일한 방법으로 실시하였다.
- <95> <실시예 5> 실시예 4의 생체물질 미세패턴을 포함하는 미소유체도관을 반응 용기로 하여, 세포의 배양 및 이를 이용하는 실험
- <96> 상기 실시예 4에 따른 생체물질 미세패턴을 포함하는 미소유체도관을 반응 용기 혹은 배양 용기로 하고, 상기 생체물질을 포함하는 지질 소포체로부터 만들어진 SPB층 미세패턴 상에 세포를 배양하였다.
- <97> 상기 실시예 4의 세포 부착을 유도하기 위한 생체물질로서는 N-CAM 을 사용하고, 이에 부착하는 세포로서는 표면에 부착하여 성장하는 신경세포를 사용하였다.
- <98> 생체물질 미세패턴의 제작은 실시예 4와 동일한 방법으로 실시하였다.
- <99> 도 6은 실시예 5에서 제작된 생체물질 미세패턴에 세포를 부착시켜 배양 혹은 실험하는 방법의 모식도를 나타내

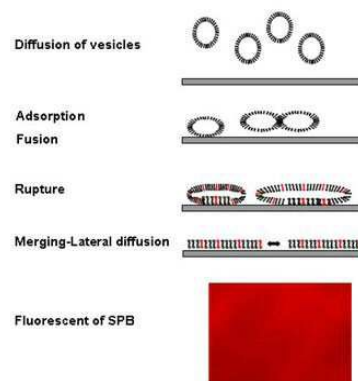
었다.

도면의 간단한 설명

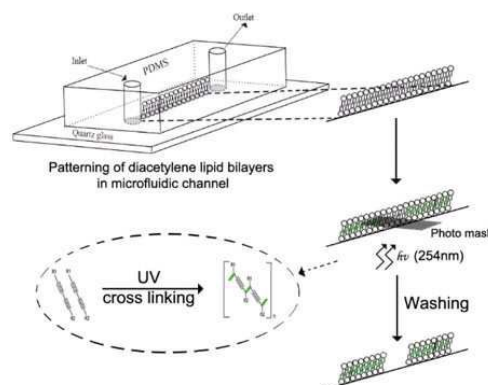
- <100> 도 1은 지질 소포체가 고체 지지체 상에 융합하여 이중지질층인 SPB(substrate supported planar lipid bilayer)를 형성하는 기작의 모식도이다.
- <101> 도 2는 미소유체도관 내에 형성된 PPB층에 대한 부분적인 광조사를 통해 광중합과정이 일어나고 이를 통해 미세패턴이 형성하는 과정의 모식도이다.
- <102> 도 3은 도 2에서와 같은 방법으로 미세패턴의 부영역을 제작하고 이에 새로운 지질 물질을 주입함으로써 미세패턴을 제작하는 방법에 대한 모식도이다.
- <103> 도 4는 광중합을 하는 지질 물질의 모식도와, 관찰을 위한 형광 물질을 포함하는 이 광중합된 지질 물질의 모식도이다.
- <104> 도 5는 도 4에 대한 해당 영역의 실제 형광관찰 결과를 나타낸 것이다.
- <105> 도 6은 본 발명의 실시예 5에 따라 제작된 생체물질 미세패턴에 세포를 부착시켜 배양 혹은 실험하는 방법의 모식도를 나타낸 것이다.

도면

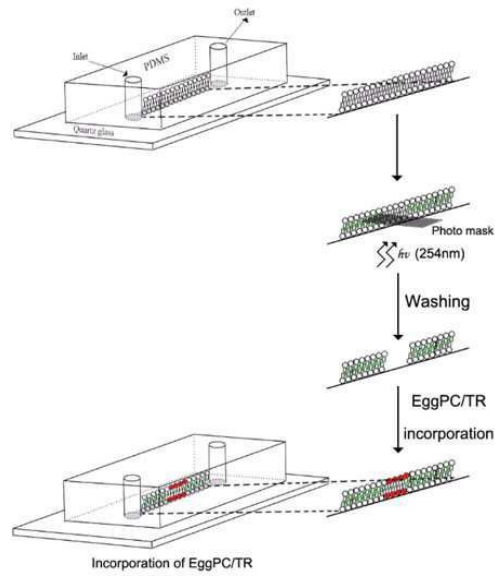
도면1



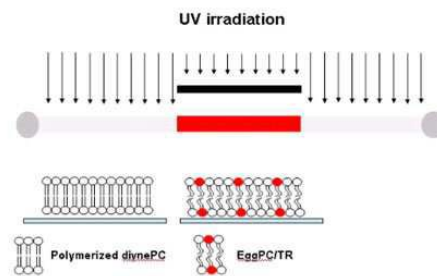
도면2



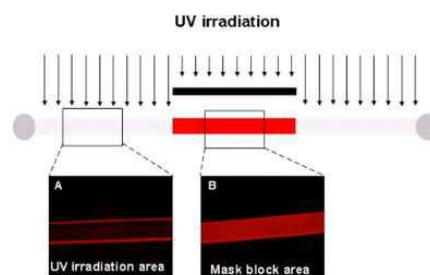
도면3



도면4



도면5



도면6

