(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0115602
(43) 공개일자 2013년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/02 (2006.01) *C12M 1/38* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0038051
(22) 출원일자 2012년04월12일
심사청구일자 2012년04월12일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이창수
대전 서구 삼천동 청솔아파트 6-1106
박애리
전라남도 여수시 소호동 359-17
(74) 대리인
김원준

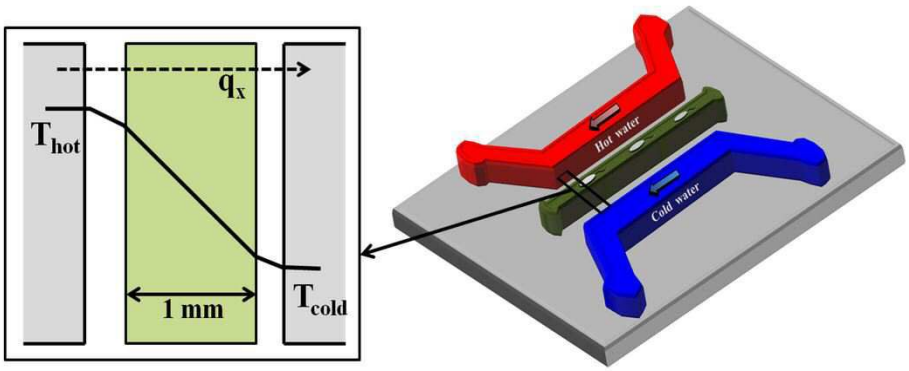
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **온도 구배가 생성되는 미세유체장비 및 이를 이용한 균주 및 생물막의 생장 특성 측정 방법**

(57) 요 약

본 발명은 미세유로에 온도 구배가 생성되는 미세유체장비와 이를 이용하여 온도에 따른 균주의 생장 특성 및 생물막(biofilm)의 형성을 빠르고 간편하며 재현성있게 측정하는 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 주입구, 배출구 및 주입구로 주입된 유체가 배출구로 이동되는 미세유로로 구성되는 검출 채널; 상기 검출 채널과 소정 간격을 두고 상기 미세유로의 양측면에 미세유로와 평행하게 각각 형성되며, 각각 다른 온도의 열매가 순환되는 온도조절용 채널;을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 온도 구배가 생성되는 미세유체장비와 이를 이용하여 온도에 따른 균주의 생장 특성 및 생물막(biofilm)의 형성을 측정하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-1271
부처명	교육과학기술부
연구사업명	PAP 사업
연구과제명	미세유체기술 기반 극지환경 모사를 통한 실시간 생물막 분석 플랫폼 개발
주관기관	한국해양연구원 부설 극지연구소
연구기간	2011.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

주입구, 배출구 및 주입구로 주입된 유체가 배출구로 이동되는 미세유로로 구성되는 검출 채널;

상기 검출 채널과 소정 간격을 두고 상기 미세유로의 양측면에 미세유로와 평행하게 각각 형성되며, 각각 다른 온도의 열매가 순환되는 온도조절용 채널;

을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 온도 구배가 생성되는 미세유체장비.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 검출 채널의 횡폭은 100~1,000 마이크론인 것을 특징으로 하는 미세유체장비.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 검출채널과 온도조절용 채널의 간격은 10~1,000 마이크론인 것을 특징으로 하는 미세유체장비.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 미세유로의 온도구배는 각 온도조절용 채널에 순환되는 열매의 온도와 유속에 의해 결정되는 것을 특징으로 하는 미세유체장비.

청구항 5

제 1 항의 미세유체장비를 사용한 균주의 생장특성 측정방법으로,

(A) 온도조절용 채널에 각각 온도가 다른 열매를 순환시켜 검출채널의 미세유로에 온도구배를 생성하는 단계;

(B) 검채채널의 주입구를 통해 균주 배양액을 주입하여 미세유로 내에서 균주를 배양하는 단계; 및

(C) 상기 배양된 균주의 생장 특성을 측정하는 단계;

를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 균주의 생장특성 측정방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 생장 특성은 온도에 따른 균주의 생장 속도 또는 모폴로지인 것을 특징으로 하는 균주의 생장특성 측정방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 생장 특성은 온도에 따른 균주의 생물막 형성 특성인 것을 특징으로 하는 균주의 생장특성 측정방법.

청구항 8

제 1 항의 미세유체장비를 사용한 생물막의 온도저항성 측정방법으로,

(A) 검출채널의 미세유로에 균주의 생물막을 형성하는 단계;

(B) 온도조절용 채널에 각각 온도가 다른 열매를 순환시켜 검출채널의 미세유로에 온도구배를 생성하는 단계;

(C) 검출채널에 배양액을 주입하여 생물막을 배양하는 단계; 및

(D) 상기 배양된 생물막의 형성 억제여부를 검출하는 단계;

를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 온도에 따른 저항성을 측정하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 (C) 단계의 배양액에 시료를 혼합하여 주입하는 것에 의해,

상기 시료에 대한 생물막의 온도에 따른 저항성을 측정하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미세유로에 온도 구배가 생성되는 미세유체장비와 이를 이용하여 온도에 따른 균주의 생장 특성 및 생물막(biofilm)의 형성을 빠르고 간편하며 재현성있게 측정하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세유체공학(microfluidics)는 수mm 이하의 단위에 제한된 유체의 흐름을 다루는 것으로, 공학, 물리학, 화학, 마이크로공학, 생명공학 등 다양한 분야에서 관심을 받고 있다. 마이크로 단위의 유체는 표면장력, 에너지 소실, 저항 등 시스템의 많은 변수들이 통상의 매크로 단위의 유체와는 다른 양상을 나타낸다. 미세유체공학은 1980년대 초반에 발생하여 잉크젯 프린터 헤드, DNA 칩, 랩온어칩(lab-on-a-chip) 등의 분야에 이용되고 있다.

[0003] 최근 미세가공기술의 발달과 더불어 미세유체공학을 이용한 미세유체장비들이 여러분야에서 사용되고 있다. 미세유체장비는 수십~수백 마이크로미터 너비와 깊이를 갖는 미세유로 내의 유체의 흐름을 이용하여 마이크로입자를 제조하거나 다양한 반응 및 분석을 행할 수 있도록 한 것이다. 미세유로 내에서 유체의 유속, 연속상과 시료의 조합, 미세유로의 설계 등을 변형하는 것에 의해 섬유, 캡슐, 비드 등 다양한 형태의 단분산성 마이크로입자를 제조할 수 있다. 또한, 미세유로 내에서는 물질의 확산, 열전달 속도가 매우 빠르고 단위 부피 당 활성 면적이 매우 넓어 월등히 균일한 온도 및 압력 구배에서 매우 적은 양의 촉매 및 반응물질을 이용하여 높은 수율로 원하는 생성물을 얻을 수 있다는 장점이 있어 이를 이용한 정밀화학제품들이 최근에 Novartis, Merck, Degussa 등의 대형 화학회사들에 의해 상용화되기 시작하였다. 특히 미세유로 내에서는 소량의 물질을 사용하여 반응과 분석이 가능하다는 장점이 있기 때문에 특히 고가의 시약을 사용하거나, 미량의 시료로 분석이 요구되는 바이오 분야에서의 응용에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

[0004] 본 출원인은 특허출원 제10-2010-111674호에서 미세유체장비의 미세유로 내에 생물막을 형성한 후, 미세유로에 농도구배를 형성하도록 시료를 주입하여 생물막의 시료감응성을 측정하는 방법과 그 장치에 대해 게시한 바 있다. 상기 방법에 의하면 일회의 실험만으로도 시료의 농도에 대한 생물막의 감응성을 간단하고 재현성있게 측정할 수 있어 신약의 개발이나 기존 약물의 품질관리 등에 효율적으로 이용할 수 있다.

[0005] 이와 같이 미세유체장비의 미세유로 내에 특정 조건을 구배지게 형성할 수 있다면, 특정 조건에 대한 화학반응

또는 균주 또는 세포 생장 특성에 대한 영향을 일회의 실험으로 간단하고 재현성있게 분석할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 다른 조건은 모두 동일한 상태에서 구배를 형성한 조건만이 다른 상태에서 반응 및 분석이 가능하므로 보다 신뢰성있는 결과를 얻을 수 있다. "온도"는 화학반응이나 생물의 생장에 있어 중요한 변수의 하나로, 화학반응의 경우 온도에 따라 반응속도가 영향을 받을 뿐 아니라 반응산물이 달라지기도 한다. "생물"의 생장에 있어서도 온도는 주요한 스트레스 요인의 하나로 온도에 따라 생장 속도의 변화는 물론 사멸의 원인이 되기도 한다. 따라서, 미세유로 내에 온도구배를 형성할 수 있는 미세유체장비를 고안할 수 있다면 상기 장비를 사용하여 화학반응이나 생물생장 특성을 분석하는 것에 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

[0006] 대부분의 세균은 인체조직, 플라스틱, 금속, 의료 임플란트 재료 표면 등 다양한 표면에 부착하여 생물막(biofilm)이라 불리우는 세균 집합체를 형성한다. 생물막 내에서 세균은 단백질, 핵산, 지질 및 엑소폴리사카라이드(exopolysaccharide)이라는 불규칙하고 복잡한 네트원크 구조로 둘러싸여 있기 때문에 외부 환경에 대한 저항성이 높고, 부유상태와는 다른 생물학적 특성을 나타낸다. 따라서 기존의 분석 방법을 이용하여 이에 대한 분석을 하기 위해서는 생물막으로부터 물리화학적 처리를 통해 미생물을 분리하여야만 분석이 가능하여 분석의 신뢰성 및 정확성의 문제점이 나타날 수 있다. 따라서, 생물막의 원형을 유지하면서 정확한 분석을 할 수 있는 기술이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허출원 제10-2010-111674호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 미세유로 내에 온도구배를 생성하는 미세유체장비를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한 본 발명은 상기 장비에 의해 균주의 생장 특성을 측정하는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 주입구, 배출구 및 주입구로 주입된 유체가 배출구로 이동되는 미세유로로 구성되는 검출 채널; 상기 검출 채널과 소정 간격을 두고 상기 미세유로의 양측면에 미세유로와 평행하게 각각 형성되며, 각각 다른 온도의 열매가 순환되는 온도조절용 채널;을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 온도 구배가 생성되는 미세유체장비에 관한 것이다.

[0011] 상기 검출 채널은 시료가 주입되어 반응, 분석되는 채널로 미세유로의 양측면에 형성된 온도조절용 채널에 순환되는 열매에 의해 미세유로 내 온도 구배가 생성된다. 검출 채널에서 미세유로의 횡폭은 실험목적에 따라 적절한 범위로 설계할 수 있으나 100~1,000 마이크론인 것이 바람직하다. 미세유로의 폭이 너무 좁으면 시료의 주입이 쉽지 않으며 미세유로의 폭이 너무 넓으면 안정된 층류를 형성하지 못하므로 온도 구배의 형성이 어려워지고, 미세유로의 폭이 너무 넓어 현미경 검출 창(detection wndow) 범위를 벗어나게 되면 관찰이 번거롭게 되는 단점이 있다.

[0012] 상기 검출채널과 온도조절용 채널의 간격은 10~1,000 마이크론인 것이 바람직하다. 검출채널과 온도조절용 채널의 간격이 좁을수록 온도조절용 채널의 열매와 미세유로의 시료간의 열교환이 효율적으로 일어나게 되나, 간격이 너무 좁으면 온도조절용 채널과 인접하게 되는 미세유로의 양말단에서의 온도 변화가 급격하게 될 수 있다. 반면 검출채널과 온도조절용 채널의 간격이 너무 넓다면 열교환의 효율성이 낮아지게 된다.

[0013] 상기 미세유로의 온도구배는 각 온도조절용 채널에 순환되는 열매의 온도와 유속에 의해 결정할 수 있다. 본 발명에서 "열매"라 함은 광의로 열을 옮겨주는 매체로서 매체 자체의 온도와 상관없이 온도 조절을 위해 사용하

는 것을 모두 아우른다. 즉, 시료에 열을 가하여 온도를 상승시키는 매체라는 협의의 '열매'와 시료로부터 열을 뺏어 온도를 하강시키는 매체라는 '냉매'를 포함하는 용매이다. 실시예에서는 -10℃와 50℃의 열매를 사용하여 미세유로 내에 4~40℃의 온도 구배를 생성하였으나, 이에 한정되지 않음은 당연하다. 즉, -10℃보다 더 낮은 온도의 열매를 사용하거나, 순환속도를 높여주는 것에 의해 4℃보다 더 낮은 온도를 달성할 수 있을 것으며, 더 높은 온도의 열매를 사용하거나 순환속도를 낮추는 것에 의해 4℃보다 더 높은 온도를 달성할 수도 있다. 미세유로 내의 상한 온도에 대해서도 동일한 원리가 적용됨은 당연하다. 온도조절용 채널과 검출 채널 간의 열교환이 효율적으로 이루어지기 위해서는 온도조절용 채널의 횡폭이 넓은 것이 더욱 유리할 것이나, 세부적인 폭, 간격, 열매의 온도, 열매의 순환속도 등은 구현하고자 하는 온도 구배에 따라 적절히 선택할 수 있을 것이다.

[0014] 본 발명의 미세유체장비는 실리콘, 유리, 금속, 세라믹 및 고분자와 같은 여러 종류의 재질을 사용하여 습식식각, 건식식각, 리소그래피(lithography), 몰딩, 밀링, 터닝, 드릴링, 펀칭, 레이저미세가공과 같은 미세가공기술을 사용하여 제작할 수 있다.

[0015] 본 발명은 또한 상기 미세유체장비를 사용한 균주의 생장특성 측정방법으로, (A) 온도조절용 채널에 각각 온도가 다른 열매를 순환시켜 검출채널의 미세유로에 온도구배를 생성하는 단계; (B) 검채채널의 주입구를 통해 균주 배양액을 주입하여 미세유로 내에서 균주를 배양하는 단계; 및 (C) 상기 배양된 균주의 생장 특성을 측정하는 단계;를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 균주의 생장특성 측정방법에 관한 것이다.

[0016] 상기 (A) 단계에서 온도조절용 채널에 열매를 순환시키는 것에 의해 미세유로에 온도구배를 생성하게 된다. 이때, 열매의 순환과 균주 배양액의 주입이 동시에 이루어질 수도 있지만, 바람직하게는 열매의 순환 후 미세유로에 안정적이 온도구배가 이루어지도록 소정 시간이 경과한 후 (B) 단계의 균주 배양액을 주입하는 것이 바람직하다.

[0017] 상기 (B) 단계에서 균주 배양액을 주입하는 것은 두 가지 방법에 의해 이루어질 수 있다. 첫 번째는, 균주가 포함된 배양액을 배양단계 동안 계속해서 주입하며 균주를 배양하는 방법이다. 두 번째는, 먼저 균주가 포함된 배양액을 주입하여 미세유로에 균주가 부착되도록 한 후, 배양액 만을 주입하여 균주를 배양하는 방법이다. 균주가 미세유로에 잘 부착되지 않는 성질을 갖는 것이라면, 첫 번째 방법을 적용하는 것이 바람직하다. 이 경우에는 검출 채널로 균주를 주입하기 전의 저장상태의 균주 배양액에서 균주의 생장이 빠르게 진행되지 않도록 하여야 한다. 두 번째 방법은 미세유로 내에 부착된 균주만의 생장을 확인하는 것이므로 온도에 따른 생장 특성을 더욱 정확하게 측정할 수 있다. 이때 배양액의 유속이 너무 빠른 경우 미세유로에 전단응력이 작용하여 부착된 균주를 박리시킬 수 있으므로 적절히 조절되어야 함은 당연하다.

[0018] 본 발명의 측정방법에 의하면 하나의 시료에 대해 여러 가지 온도에 대해서 각각의 실험을 하지 않고 한 번의 실험만으로도 온도에 따른 균주의 생장특성을 간단하고 재현성있게 측정할 수 있다.

[0019] 본 발명의 생장특성 측정방법은 모든 균주에 적용이 가능하다. 또한, 상기 생장 특성으로는 온도에 따른 균주의 생장 속도 또는 모폴로지 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에 의한 생장특성의 측정방법에서 균주의 배양이 완료되면 검출채널을 세척하여 미세유로 내에 부착되지 않았거나 약하게 부착된 균주를 제거한 후 생물막이 형성되었는지를 관측하는 것에 의해 온도에 따른 생물막 형성 특성을 용이하게 관측할 수 있다.

[0021] 상기와 같은 균주의 생장 특성이나 생물막 형성 특성은 광학현미경을 사용하여도 용이하게 검출할 수 있으나, 균주에 표지를 하는 것에 의해 정량적으로 생장특성과 생물막 형성정도를 측정할 수 있다. 예를 들면 형광을 발하는 유전자에 의해 재조합된 균주를 사용할 수도 있으며, 단순히 형광염료, 자기입자, 방사선 동위원소 또는 양자점과 같이 통상의 바이오 분야에서 표지물질로 사용되는 것에 의해 표지하여도 무방하다. 이때, 검출 방법은 표지 방법에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0022] 또한 상기 미세유체장비를 사용하면, 균주의 생장 특성 뿐 아니라 이미 형성된 생물막의 온도저항성을 측정할 수도 있다. 즉, (A) 검출채널의 미세유로에 균주의 생물막을 형성하는 단계; (B) 온도조절용 채널에 각각 온도가 다른 열매를 순환시켜 검출채널의 미세유로에 온도구배를 생성하는 단계; (C) 검출채널에 배양액을 주입하여 생물막을 배양하는 단계; 및 (D) 상기 배양된 생물막의 형성 억제여부를 검출하는 단계;에 의해 생물막의 온도에 따른 저항성을 측정할 수 있다. 하기 실시에에서는 이미 형성된 생물막의 온도저항성 측정에 대해서는 구체적인 데이터를 제시하지 않았으나, 실시예에 기재된 방법에서 미세유로에 온도 구배를 생성하기 전에 생물막을

형성하는 것에만 차이가 있을 뿐이므로 이를 실현하는 것은 당업자라면 용이하게 실시할 수 있을 것이다. 생물막의 형성 억제여부는 전술한 균주의 생장특성 측정 시와 동일한 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0023] 상기 (A) 단계는 (a) 미세유로에 세균을 부착시키는 단계; (b) 미세유로에 부착되지 않은 세균을 세척하는 단계; 및 (c) 부착된 세균을 배양하여 생물막을 형성하는 단계로 나뉘어 이루어지는 것이 바람직하다. 먼저 미세유로에 느린 유속으로 세균 현탁액을 흘려주면 미세유로에 유입된 세균의 대부분이 부착되게 된다. 그러나 일부의 세균은 미세유로에 부착되지 않고 부유상태로 존재하거나, 약하게 부착되어 있는 것이 남아있게 있다. 부유상태의 세균이 남아있게 되면 검출과정에서 오차가 생길 수 있으므로 생물막 형성 전에 이를 제거하는 것이 바람직하다. 부유상태의 세균을 제거한 후에는 배양액을 흘려주며 배양하여 생물막을 형성한다.

[0024] 이때, 상기 배양액에 시료를 혼합하여 주입한다면, 상기 시료에 대한 생물막의 온도에 따른 저항성을 측정할 수 있다. 즉, 시료가 없는 상태의 온도에 따른 저항성과 시료 존재 상태의 온도에 따른 저항성을 비교하는 것에 의해 시료에 의한 생물막의 온도에 따른 저항성의 변화를 측정할 수 있다. 상기 시료로는 산, 염기, 산화제, 환원제와 같은 환경적인 요인이나, 항생제와 같은 약물일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 이상과 같이 본 발명의 미세유체장비에 의하면 검출채널의 미세유로 내에 온도 구배를 생성할 수 있어 미세유로 내에서의 반응 및 분석에 있어 온도의 영향을 간단한 방법으로 재현성있게 측정하는 것이 가능하다.

[0026] 예를 들면, 상기 장비를 이용하면 온도에 따른 단백질의 결정화, 상태도(phase diagram), 화학반응에 대한 온도의 영향을 측정하거나, 생물체의 저온 및 고온 환경에서의 생태, 온도에 대한 스트레스 저항성 등을 간편하게 측정할 수 있다. 또한 식품산업, 정밀화학물질의 생산, 환경 오염물의 생명공학적 처리, 세제 산업 등의 분야에서도 온도에 대한 효과의 측정에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체 장비를 보여주는 모식도.

도 2는 도 1의 미세유체 장비의 검출채널에서 온도구배가 직선적으로 생성됨을 보여주는 그래프.

도 3 본 발명의 실시예에 사용된 균주에 대한 정보를 나타내는 도면.

도 4 내지 도 7은 본 발명의 일 실시예에 의한 미세유체 장비에서 생물막의 형성과정을 보여주는 명시야상 및 형광현미경 사진.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 의한 미세유체 장비에서 온도 구배에 따른 셀 성장형태의 차이를 보여주는 명시야상.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하 첨부된 도면과 사전실험 및 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0029] **실시예 1 : 미세유체 장비의 제작**

[0030] 미세유체 장비는 소프트 식각법(soft lithography)에 의해 도 1과 같이 각각 하나의 주입구와 배출구를 갖는 세 개의 미세유로를 갖도록 제작하였다. 도 1에서 가운데에 형성된 미세유로는 시료의 주입에 의해 균주가 부착 및 성장하는 검출 채널이며, 양 옆의 미세유로는 시료용 미세유로에 온도 구배를 형성할 수 있도록 각각 냉매와 열매가 주입되는 온도조절용 채널이다.

[0031] 구체적으로 실리콘 웨이퍼 위에 네가티브형 감광제(SU-8, Microchem Co., USA)를 고르게 도포한 후, 2,000rpm으로 스핀 코팅하여 100 ㎛ 높이로 감광제를 코팅하였다. 감광제에 도 1과 같은 미세유로 형상이 있는 마스크를

통해 UV를 조사하여 채널과 반대 형상을 갖는 마스터 몰드를 제작하였다. 도 1의 미세유로에서 검출 채널 및 온도조절용 채널의 넓이 및 검출 채널과 각 온도조절용 채널 사이의 간격은 1 mm 였다.

[0032] 이후, PDMS(Sylgard 184; Dow Corning, Midland, MI)의 base와 경화제의 10:1 (w/w) 혼합물을 제작된 마스터 몰드에 부어준 후 65℃에서 4시간 경화시켜 원하는 형상의 미세유로를 가진 PDMS 몰드를 제작하였다. 이렇게 만들어진 PDMS 몰드에 유리 기판을 산소 플라즈마(PDC-002, Harrick, USA) 처리를 통해 붙여 미세유체 장치를 제작하였다.

[0033] **실시예 2 : 농도구배 검정곡선 작성**

[0034] 온도에 민감한 형광 다이인 로다민 B(Rhodamine B)를 이용하여 상기 실시예 1에서 제작한 미세유체 장비의 검출 채널에서 온도 구배가 일어나는 것을 시각화하여 확인하고, 온도구배에 대한 검정곡선(calibration curve)을 얻었다.

[0035] 순환펌프를 이용하여 온도조절용 채널의 한쪽에는 -10℃의 냉매를, 다른 한쪽에는 50℃의 열매를 각각 0.1㎖/min과 0.4㎖/min의 속도로 주입하였다. 냉매와 열매를 주입한 지 10분 후 검출 채널에 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 사용하여 제조한 1mM 로다민 B 용액을 5 ㎕/min의 속도로 주입하였다.

[0036] 검출 채널에서 CCD 카메라(Coolsnap cf, Photometrics, USA)가 장착된 inverted fluorescence microscope, TE2000, Nikon, Japan)을 사용하여 로다민 B의 형광을 측정하고, 각 온도에서의 1mM 로다민 B의 형광강도를 나타내는 표준곡선으로부터 채널 내 온도구배를 구하였다. 도 2의 (a)는 1mM 로다민 B의 온도에 따른 형광강도의 표준곡선이며, (b)는 상기 조건에서의 검출 채널의 온도 구배를 나타내는 그래프이다. 도 2로부터 검출 채널 내 4~40℃의 온도구배가 선형적으로 형성되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0037] **실시예 3 : 온도 구배에 따른 성장 측정**

[0038] 1) 균주의 배양

[0039] 극지방으로부터 채취한 박테리아인 *Pseudoalteromonas sp.(2종), Pseudoalteromonas arctica, Pseudoalteromonas tetraodonis(3종), Shewanella sp., Shewanella vesiculosa, Shewanella frigidimarina, Cellulophaga sp., Cellulophaga algicola* 11종을 극지연구소로부터 입수하였다. 각 균주에 대한 정보는 도 3에 도시하였다.

[0040] 상기 분양받은 균주를 MR2A 고체 배지(sigma aldrich)에 각각 도말하여 25℃에서 16시간 배양하여 stock을 제조하였다. Yeast extract, Protease peptone, Casamino acid, Dextrose, Soluble starch 각각 0.5 g/L과 Sodium pyruvate, Potassium phosphate(di) 0.3 g/L, Magnesium sulfate 0.05 g, Sea salt 40g/L 이 포함된 MR2A 액체배지에서 상기 stock을 25℃에서 16시간동안 재배양하여 박테리아 용액을 제조하였다. 배양된 박테리아는 600nm에서 UV spectrophotometer (UV-160, Shimadzu, Japan)를 이용하여 OD값이 1이 되도록 배지로 희석하여 하기 실시예에서 검출 채널 주입에 사용하였다.

[0041] 2) 온도구배에 따른 생물막 형성 측정

[0042] 실시예 1에서 제조한 미세유체 장비를 사용하여 실시예 2의 온도 구배 조건에서 1)의 박테리아 용액을 사용하여 상기 박테리아의 생물막 형성에 대한 온도 감응성을 측정하였다. 실시예 2의 로다민 B 용액 대신 검출 채널에 1)에서 제조한 박테리아 용액을 미세유로에 부착시켰다. 이후, MR2A 배양액을 5 $\mu\ell/min^{-1}$의 속도로 배출구로부터 주입하면서 균주를 배양하면서 광학 현미경을 사용하여 검출 채널에 균주의 생물막이 형성되는 것을 관찰하였다.

[0043] 도 4~도 7은 상기 박테리아 중 *Psedoalteromonas tetraodonis*와 *Pseudoalteromonas sp.*의 0h, 4h, 8h, 12h, 24h의 명시야상(bright field image)이다. 생물막 형성이 빠른 *Psedoalteromonas tetraodonis*의 경우에는 12h까지 관측하였다. 도 4~도 6으로부터 균주가 용액 중에서 planktonic cells 상태로 부유되어 있다가 채널의 표면에 부착하고, 채널의 표면에서 성장하고 분화되어 클러스터를 형성한 후, 입체적인 구조물의 형태를 지니는 생물막을 형성하고 입체적인 구조물로 계속 성장, 분화되어 생물막이 형성되는 과정을 보여준다. 이러한 생물

막의 형성과정이 온도 구배에 따라 다른 속도와 정도로 진행되는 것을 확인할 수 있다.

[0044] 온도 구배에 따른 생물막 형성을 보다 확실히 확인하기 위하여, 24시간 후 배양액의 주입을 멈추고 phosphate buffer(pH=7.2)를 5㎕/min의 속도로 5분간 흘려주어 채널에 부착되지 않거나 약하게 부착되어 있는 박테리아를 세척하였다. 이후 Acridine orange(sigma Aldrich)를 50mM의 농도로 phosphate buffer (pH=7.2)로 희석하여 5㎛/min의 유속으로 5분간 채널 내에 주입하여 생물막을 염색한 후 PBS buffer를 5㎕/min로 5분간 주입하여 세척하였다. 형광 현미경(NIKON, TE2000, Japan)을 사용하여 미세유체장비 내에 형성된 생물막의 형광 이미지를 측정하고 도 4~6의 명시야상과 함께 도시하였다.

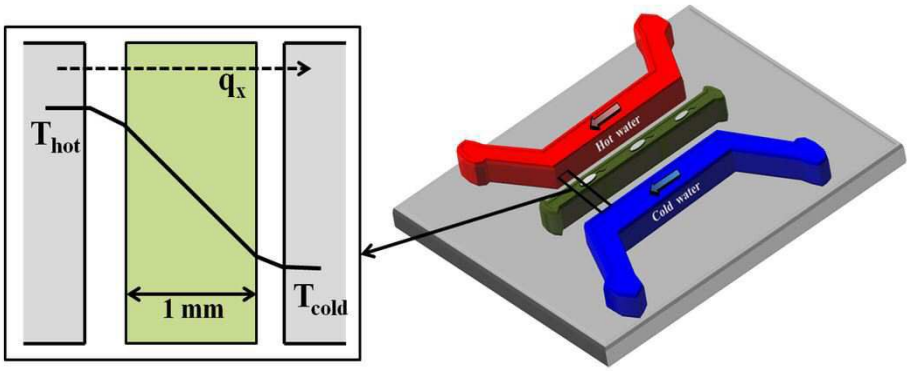
[0045] 도 4~도 7로부터 균주에 따라 생물막의 생성이 온도에 따라 영향을 받음을 알 수 있다. 즉, 도 4의 균주는 채널의 전 온도 구간에서, 도 5의 균주는 4~15℃에서, 도 6의 균주는 30~40℃에서 생물막이 가장 두텁게 형성되었음을 확인할 수 있다.

[0046] 3) 온도구배에 따른 셀의 형태(morphology) 관측

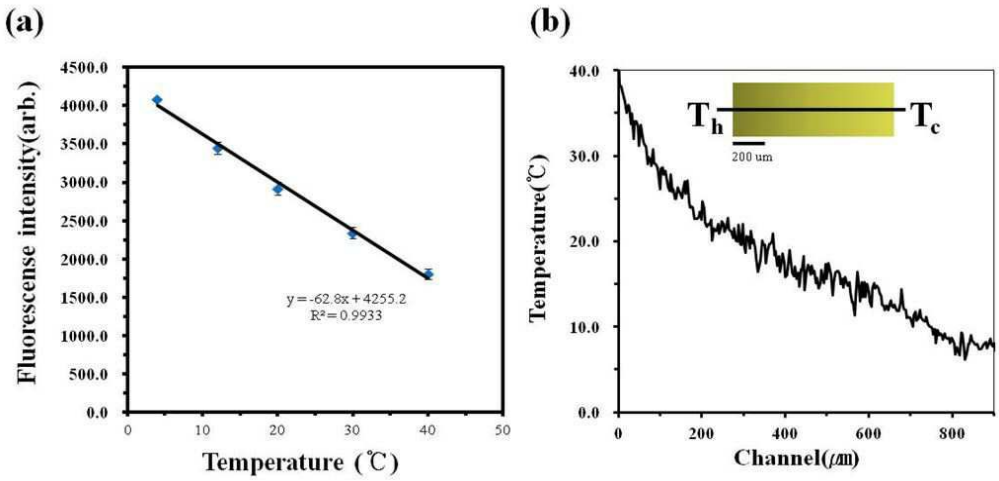
[0047] 2)와 동일한 방법에 의해 미세유체장비의 검출 채널에 균주를 주입하면서 8시간 후 셀의 형태를 위상차 현미경(NIKON, TE2000, Japan)을 사용하여 관측하고 그 결과를 도 7에 도시하였다. 도 7로부터 미세유체장비의 채널 내에 온도 구배에 따라 균주 셀의 크기 및 형태가 변화되고, 특정온도에서 filamentation이 일어남을 확인하였다.

도면

도면1



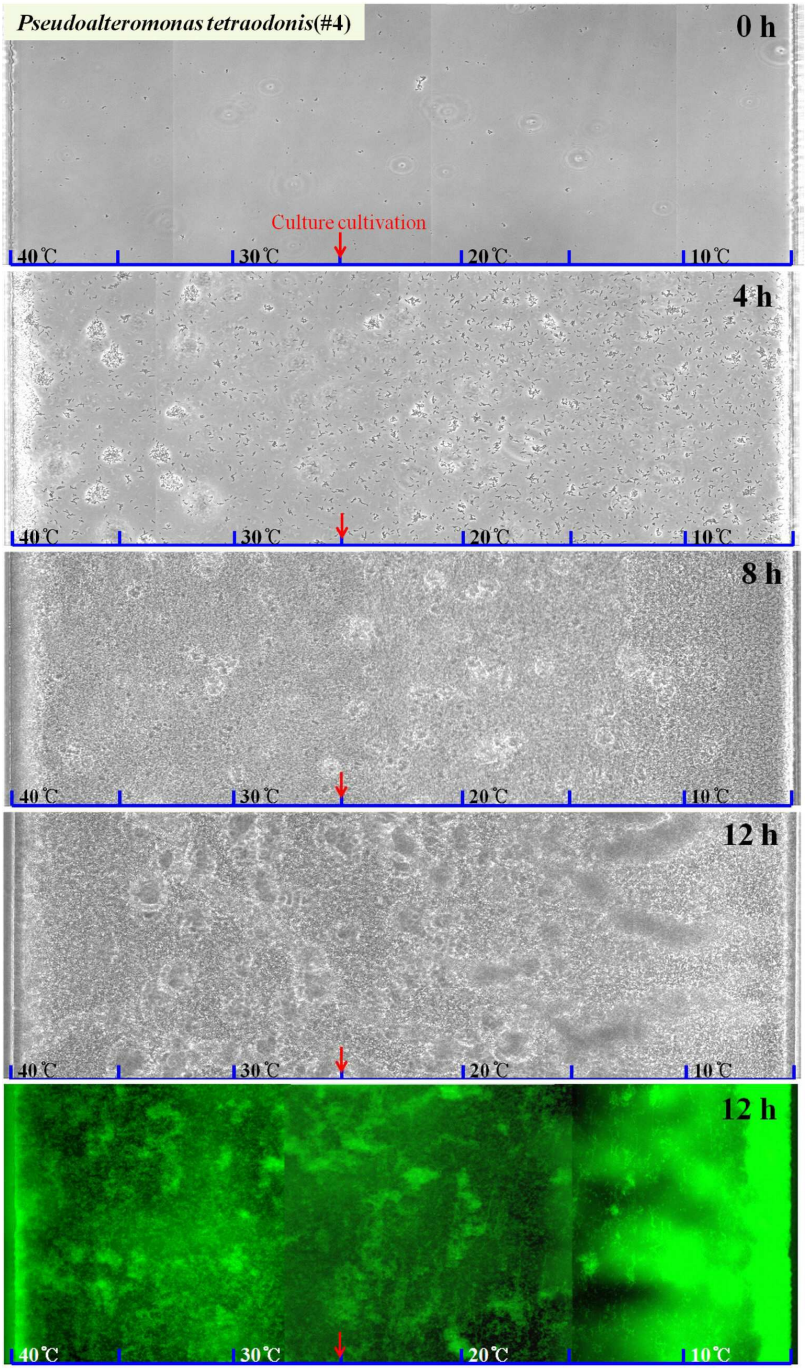
도면2



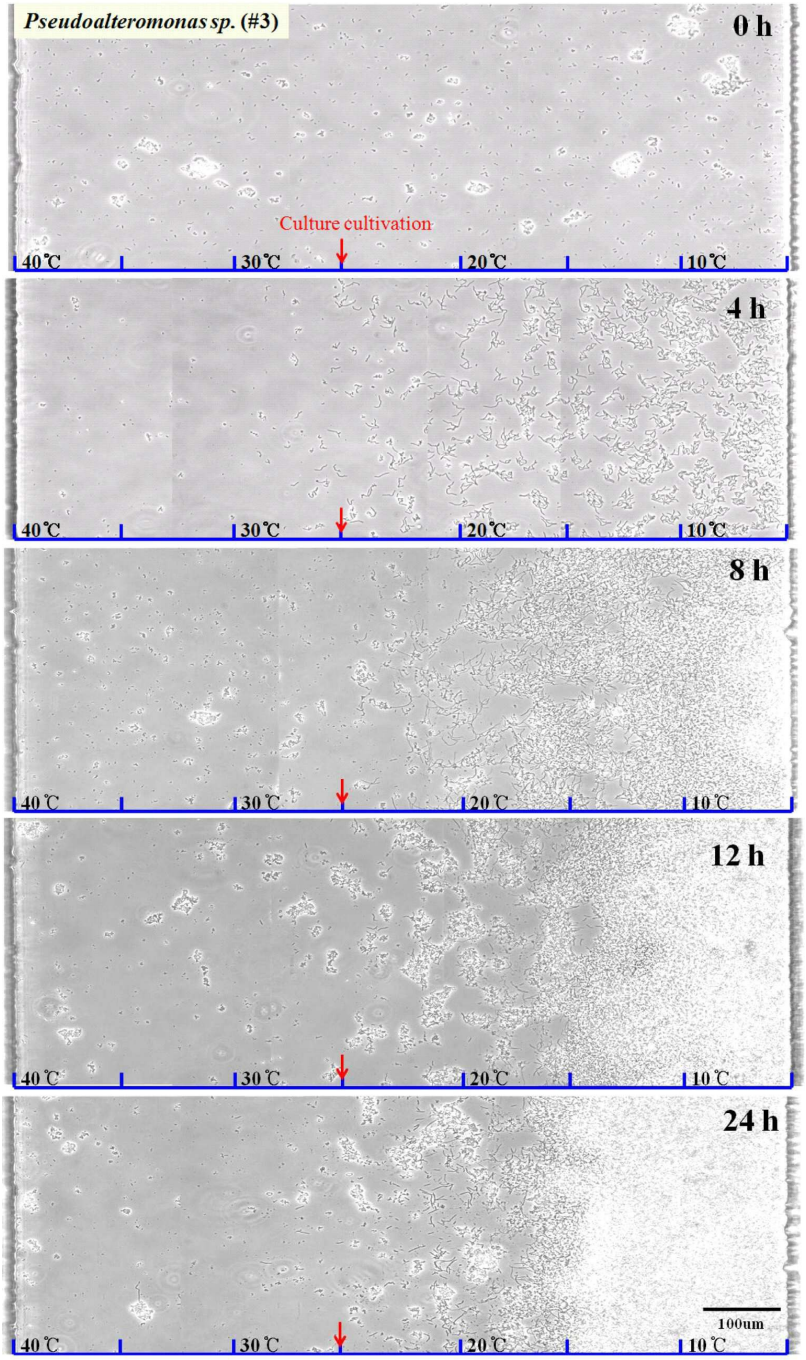
도면3

	Scientific name	Isolation Temp.	Isolation media	Identification data	Category	Ocean /Continent	Country
1	*Pseudoalteromonas sp.*	25C	Marine agar	16S rDNA (1432 bp) [99.93%]	Soil (terrestrial)	Antarctica	South Shetland Islands
2	*Pseudoalteromonas arctica*	25C	ZoBell agar	16S rDNA (1410 bp) [99.858%]	unknown	Antarctica	South Shetland Islands
3	*Pseudoalteromonas sp.*	25C	ZoBell agar	16S rDNA (1446 bp) [99.93%]	unknown	Antarctica	South Shetland Islands
4	*Pseudoalteromonas tetraodonis*	25C	ZoBell agar with chitin	16S rDNA (1406 bp) [100%]	Sediment (marine)	Europe	Kara Sea
5	*Pseudoalteromonas tetraodonis*	25C	ZoBell agar with chitin	16S rDNA (1404 bp) [99.858%]	Sediment (marine)	Europe	Kara Sea
6	*Shewanella vesiculosa*	25C	ZoBell agar with chitin	16S rDNA (1416 bp) [100%]	Sediment (marine)	Europe	Kara Sea
8	*Shewanella frigidimarina*	25C	ZoBell agar	16S rDNA (1504 bp) [99.324%]	Soil (terrestrial)	Antarctica	South Shetland Islands
9	*Cellulophaga sp.*	25C	ZoBell agar	16S rDNA (1134 bp) [99.625%]	Soil (sea shore)	Antarctica	South Shetland Islands
10	*Cellulophaga algicola*	4C	ZoBell agar	16S rDNA (1491 bp) [98.935%]	Water (sea)	Europe	Norway
11	*Shewanella sp.*	25C	ZoBell agar	16S rDNA (1438 bp) [97.461%]	Water (sea)	Europe	Norway
12	*Pseudoalteromonas tetraodonis*	25C	ZoBell agar with chitin	16S rDNA (1404 bp) [100%]	Sediment (marine)	Europe	Kara Sea

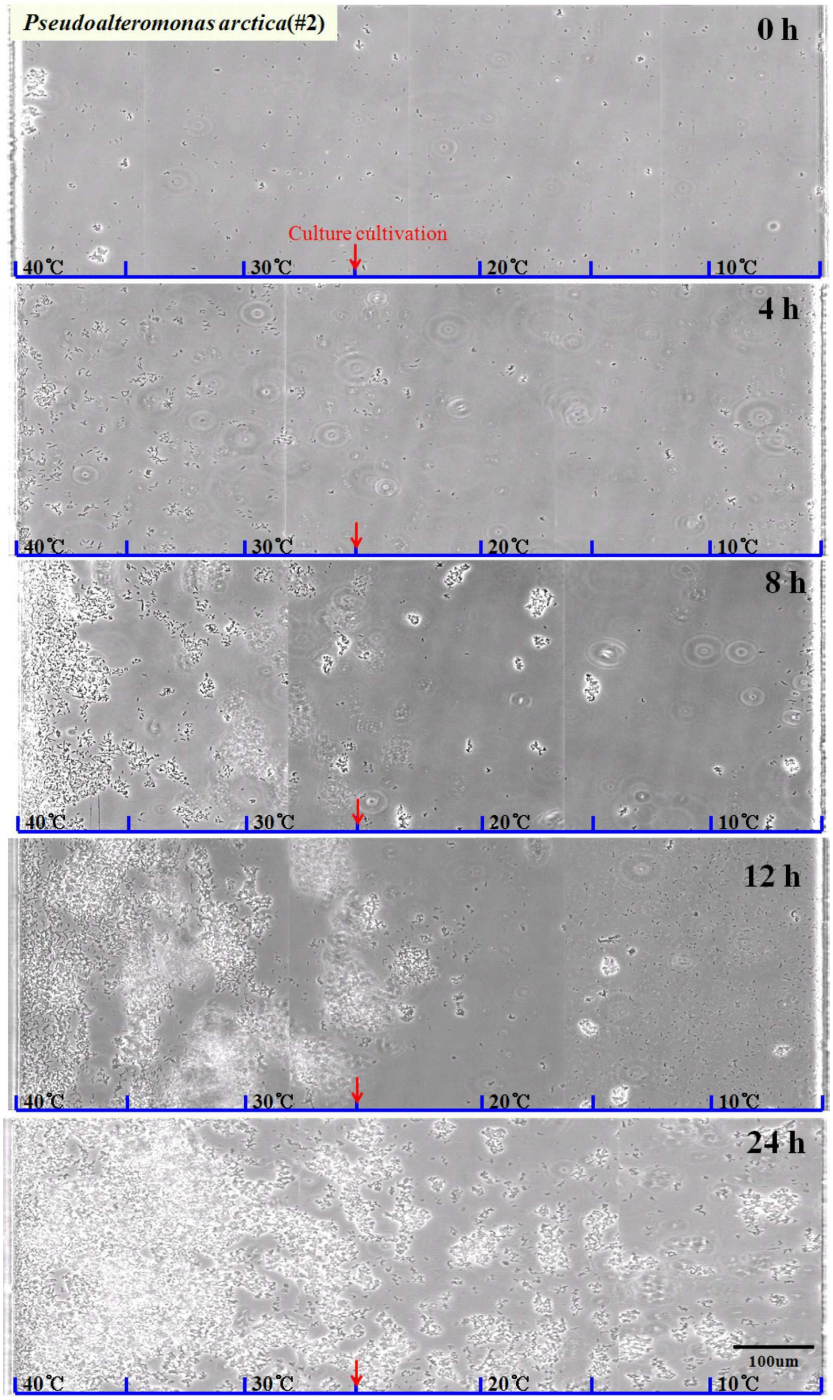
도면4


Pseudoalteromonas tetraodonis(#4)
0 h
Culture cultivation
40℃
30℃
20℃
10℃
4 h
8 h
12 h
12 h

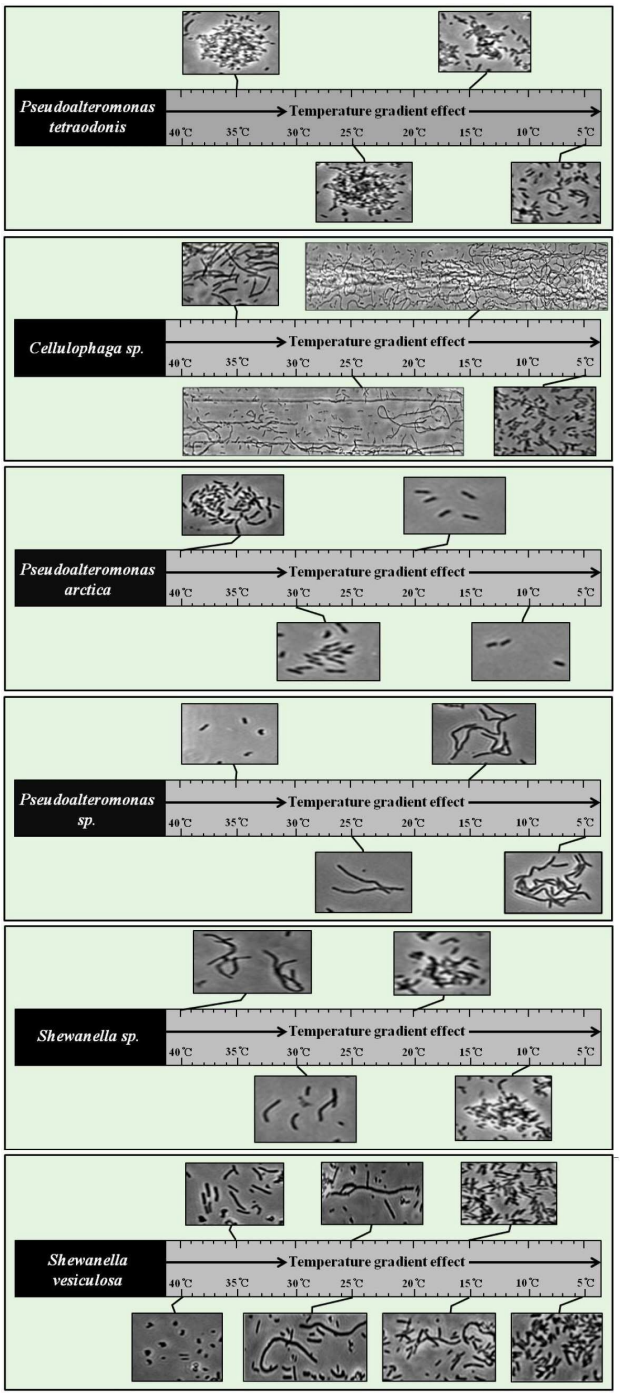
도면5


Pseudoalteromonas sp. (#3)
0 h
Culture cultivation
40℃
30℃
20℃
10℃
4 h
8 h
12 h
24 h
100um

도면6


Pseudoalteromonas arctica(#2)
0 h
Culture cultivation
40℃
30℃
20℃
10℃
4 h
8 h
12 h
24 h
100um

도면7


Pseudoalteromonas tetraodonis
Temperature gradient effect
40℃ 35℃ 30℃ 25℃ 20℃ 15℃ 10℃ 5℃
Cellulophaga sp.
Temperature gradient effect
40℃ 35℃ 30℃ 25℃ 20℃ 15℃ 10℃ 5℃
Pseudoalteromonas arctica
Temperature gradient effect
40℃ 35℃ 30℃ 25℃ 20℃ 15℃ 10℃ 5℃
Pseudoalteromonas sp.
Temperature gradient effect
40℃ 35℃ 30℃ 25℃ 20℃ 15℃ 10℃ 5℃
Shewanella sp.
Temperature gradient effect
40℃ 35℃ 30℃ 25℃ 20℃ 15℃ 10℃ 5℃
Shewanella vesiculosa
Temperature gradient effect
40℃ 35℃ 30℃ 25℃ 20℃ 15℃ 10℃ 5℃