



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월12일
(11) 등록번호 10-1393396
(24) 등록일자 2014년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/48 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 35/08 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0064711
(22) 출원일자 2013년06월05일
심사청구일자 2013년06월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110005091 A
KR1020100073241 A
KR101210590 B1
KR1020050110810 A

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이창수
대전 서구 둔산로 223, 1동 703호 (둔산동, 청솔
아파트)
정현호
보령시 주공로 33 206동 1006호(명천동, 주공2차
아파트)
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 8 항

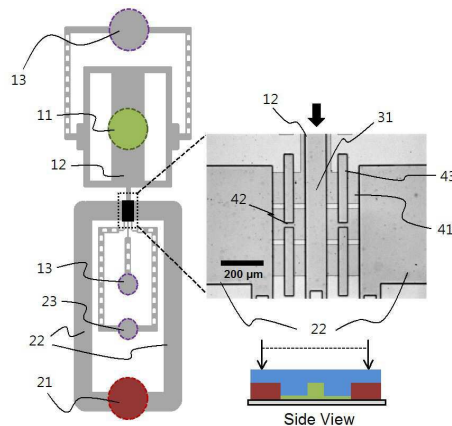
심사관 : 김민석

(54) 발명의 명칭 주화성 분석을 위한 미세유체장치 및 이를 이용한 주화성 분석방법

(57) 요약

본 발명은 박테리아의 주화성 분석을 위한 미세유체장치 및 이를 이용한 주화성 분석방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 기관(51) 상에 미세유체가 형성된 몰드(61)를 합착하여 형성되는 미세유체장치에 있어서, 제1용액이 수용되는 제1수용부(11)와 제1배출구(13)가 연결된 제1미세유로(12), 제2용액이 수용되는 제2수용부(21)와 제2배출구(23)가 연결된 제2미세유로(22), 제1미세유로(12)와 제2미세유로(22)가 교차하는 검출채널(31)로 구성되어 있으며, 상기 검출채널(31)과 제2미세유로(22) 사이에는, 상부에 공기가 수용될 수 있는 한 쌍의 공기채널(43)이 1~10 μ m 폭의 교차유로(42)를 사이에 두고 폭 방향으로 배치되어 있고, 깊이는 1~10 μ m로 제2미세유로 깊이의 1/3 보다 얇은 확산채널(41)이 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 주화성 관측을 위한 미세유체장치와 이를 이용한 주화성 분석방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

기관(51) 상에 미세유로가 형성된 몰드(61)를 합착하여 형성되는 미세유체장치에 있어서,
제1용액이 수용되는 제1수용부(11)와 제1배출구(13)가 연결된 제1미세유로(12),
제2용액이 수용되는 제2수용부(21)와 제2배출구(23)가 연결된 제2미세유로(22),
제1미세유로(12)와 제2미세유로(22)가 교차하는 검출채널(31)로 구성되어 있으며,
상기 검출채널(31)과 제2미세유로(22) 사이에는,
상부에 공기가 수용될 수 있는 한 쌍의 공기채널(43)이 2~50 μm 폭의 교차유로(42)를 사이에 두고 폭 방향으로 배치되어 있고, 깊이는 1~10 μm 로 제2미세유로 깊이의 1/3보다 얇은 확산채널(41)이 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 주화성 관측을 위한 미세유체장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 제2미세유로(22)는 제1미세유로(12)의 양측에서 T형으로 교차하며,
상기 확산채널(41)은 검출채널(31)과 제2미세유로(22)의 사이 양측에 한 쌍 존재하는 것을 특징으로 하는 주화성 관측을 위한 미세유체장치.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,
상기 기관(51)은 제1용액에 대한 접촉각이 0~50도이며,
상기 몰드(61)는 제1용액에 대한 접촉각이 90~110도인 것을 특징으로 하는 주화성 관측을 위한 미세유체장치.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항의 미세유체장치를 이용하며,
(A) 제1수용부(11)와 제1미세유로(12)에 제1용액으로 박테리아용액을 채우는 단계;
(B) 제2수용부(21)와 제2미세유로(22)에 제2용액으로 주화성을 측정하고자 하는 시료용액을 채우는 단계; 및
(C) 검출채널(31)의 소정 영역에서 시간에 따른 박테리아의 개체수의 변화를 측정하는 단계;
를 포함하는 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
상기 박테리아는 표지된 박테리아를 사용하는 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
상기 박테리아 용액은 두 가지 이상의 박테리아의 혼합 용액으로서,
상기 박테리아는 서로 다른 표지물질로 표지되어 있어,
두 가지 이상의 박테리아의 주화성을 동시에 측정하는 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석 방법.

청구항 7

제 4 항에 있어서,
상기 (C) 단계의 측정으로부터 시간 당 박테리아 개체수의 변화(개체수/시간)를 계산하여 유인강도 또는 기피강도를 정량화하는 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석 방법.

청구항 8

제 4 항에 있어서,
상기 (C) 단계의 측정 결과, 상기 시료가 시간에 따라 유인물질 또는 기피물질로 작용하는 경우, 농도구배에 대한 표준곡선을 이용하여 시간 당 박테리아 개체수의 변화가 0인 점으로부터 유인물질과 기피물질의 임계농도를 구하는 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 박테리아의 주화성 분석을 위한 미세유체장치 및 이를 이용한 주화성 분석방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 특정 화학물질에 반응하여 이동성을 갖는 특징을 주화성이라 한다. 박테리아는 편모를 가지고 있어 운동의 형태에 따라 직선 및 방향회전이 가능하다. 주화성에 의한 박테리아의 운동성은 화학적 자극에 의해 물리적인 에너지로 변환되어 유인물질(attractant)에 모여들거나, 기피물질(repellent)로부터 도망가는 경향을 보인다. 박테리아 주화성은 표면의 수용체에 의한 신호전달 기작에 의해 결정되며 외부의 미세한 화학물질 및 농도를 감지할 수 있다. 이러한 박테리아 주화성은 미세생물 먹이망, 신진대사, 오염물 생물학적 정화, 질병발병과 깊은 관계가 있어 생물학적 중요성이 대두되고 있다. 박테리아 주화성의 정성/정량 분석은 이들의 외부환경에 대한 반응성 및 다양한 생물학적 상호작용 및 기작을 이해하는데 핵심적인 요소가 된다.

[0003] 종래 주로 이용된 박테리아 주화성 분석 방법은 swarm plate 분석법과 모세관 분석법이 있다. 하지만, 이 방법들은 농도구배 조절의 어려움, 장시간의 분석시간 및 박테리아의 개체수의 정량분석에 따른 부정확성 등의 단점이 제시되어왔다. 최근 현미경의 발달로 미세크기의 미생물의 관찰이 용이해 지면서 현미경을 기반으로 하는 미세유체 기술이 개발되고 있으며, 이는 미세유체의 제어가 용이할 뿐만 아니라 농도구배를 안정적으로 형성할 수 있어 박테리아의 주화성에 대해 더욱 정확한 정량 분석이 가능하다.

[0004] 기존의 미세유체를 이용한 농도구배 형성은 연속적인 흐름 기반의 확산과 정적시스템 기반의 확산으로 분류된다. 연속적인 흐름 기반의 분석법은 미세유체 내에서의 층류흐름과 확산에 의해 농도구배를 형성하며, 선형, 포물선 같은 다양한 형태의 농도구배를 형성할 수 있다. 본 발명자들은 등록특허 제10-1210590호에 미세채널 내 농도구배를 형성하여 생물막의 시료감응성을 측정할 수 있는 미세유체장치 및 시료감응성 측정방법을 게재한 바 있다. 하지만, 이러한 장치는 연속적인 유체흐름을 조절하기 위한 펌프 및 유체조절장치 등의 장비가 필요할 뿐 아니라, 박테리아의 운동에 의한 주화성을 측정하는 경우에는 펌프의 맥동이나 유체흐름으로 인한 전단력이 박테리아의 운동성에 영향을 미치기 때문에 정확한 주화성의 분석이 어렵다는 단점이 있다.

[0005] 정적시스템 기반의 분석 방법은 유체의 흐름 없이 농도구배를 형성하므로 박테리아의 운동성에 영향을 주지 않아 보다 정확한 주화성의 분석이 가능하다. 통상의 정적시스템은 미세한 구멍을 가지고 있는 막 또는 히드로겔을 이용하여 농도구배를 형성하며, 박테리아가 화학물질의 근원지역으로의 이동을 제한하여 농도구배에 의한 분석만이 가능하다. 하지만, 미세유체 장치 내에 히드로겔을 형성하였을 때 결합이 약해 불안정하며 제작 공정이 매우 복잡해진다. 또한, 히드로겔 내부의 불균일한 미세구멍의 크기는 농도구배를 형성하는데 있어 재현성이 현저히 떨어지게 되며, 화학물질이 미세구멍의 크기를 통과하여 확산이 이루어지므로 속도가 느려질 수밖에 없다. 미세유체칩을 이용한 박테리아 주화성의 정량분석을 위해 상기의 문제점을 해결하여야 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1210590호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 유체의 흐름에 의한 영향을 배제할 수 있으면서도, 미세유체 장치 내에 막이나 히드로겔을 장착하지 않고도 액체-액체 계면에 의한 확산에 의해 농도구배를 형성하여 빠르고 재현성있게 박테리아의 주화성을 검출할 수 있는 미세유체장치를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한 본 발명은 상기 장치를 이용하여 박테리아의 주화성을 정성 또는 정량적으로 분석하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 더 나아가 본 발명은 상기 장치를 이용하여 농도에 따라 박테리아에 대해 유인현상과 기피현상을 동시에 나타내는 화학물질에 대한 이중의 동적운동성을 관찰하고, 유인현상과 기피현상의 임계농도를 측정할 수 있는 분석 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 진술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 기관(51) 상에 미세유로가 형성된 몰드(61)를 합착하여 형성되는 미세유체장치에 있어서, 제1용액이 수용되는 제1수용부(11)와 제1배출구(13)가 연결된 제1미세유로(12), 제2용액이 수용되는 제2수용부(21)와 제2배출구(23)가 연결된 제2미세유로(22), 제1미세유로(12)와 제2미세유로(22)가 교차하는 검출채널(31)로 구성되어 있으며, 상기 검출채널(31)과 제2미세유로(22) 사이에는, 상부에 공기가 수용될 수 있는 한 쌍의 공기채널(43)이 2~50 μ m 폭의 교차유로(42)를 사이에 두고 폭 방향으로 배치되어 있고, 깊이는 1~10 μ m로 제2미세유로 깊이의 1/3보다 얇은 확산채널(41)이 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 주화성 관측을 위한 미세유체장치에 관한 것이다.

[0011] 도 2은 본 발명의 일 실시예에 의한 전체 미세유체장치의 구조와 검출채널과 확산채널 영역의 세부구조를 보여주는 도면이며, 도 3은 상기 미세유체장치의 작동과정을 보여주는 모식도이다.

[0012] 제1수용부에 제1용액을 주입하면 제1미세유로를 거쳐 검출채널을 채우게 된다. 제1미세유로의 말단에는 배출구가 형성되어 있어 제1용액이 제1수용부에 채워질 때 미세유로에 채워져 있던 공기를 외부로 배출시켜 미세유로 내 용액의 원활한 흐름을 유도하며 과량의 용액을 배출시킨다. 검출채널에 제1용액이 채워지면 제1용액은 모세관현상에 의해 확산채널에 채워지게 되며, 모세관 밸브작용에 의해 확산채널의 말단에서 흐름이 멈추게 된다. 모세관 현상과 모세관 밸브작용이 효과적으로 이루어질 수 있도록 상기 확산채널의 깊이는 제2미세유로 깊이의 1/3이하로, 1~10 μ m인 것이 바람직하다. 확산채널의 깊이가 10 μ m 이하라면 모세관현상이 효율적으로 작동하지 않으며, 반면 확산채널의 깊이가 1 μ m이하라면 확산 속도가 너무 느려질 수 있다. 이때 제1배출구는 하나만을 형성할 수도 있으나, 하기 실시예에서는 보다 제1용액이 보다 원활하게 미세유로를 채울 수 있도록 상단과 하단에 각각 하나씩을 형성하였다.

- [0013] 이후, 제2수용부에 제2용액을 주입하면, 제2미세유로를 채우면서 확산채널의 제1용액과 만나게 되며, 제1배출구와 마찬가지로 원리로 제2배출구에 의해 미세유로에 채워져 있던 공기와 과량의 제2용액이 제거된다. 제2용액은 확산채널과 접하는 제2미세유로의 말단에서 제1용액과 접하게 되면, 교차유로를 통하여 검출채널로 확산되어 검출채널에 시간에 따른 농도구배가 이루어지게 된다. 이때, 확산채널의 상부에 존재하는 공기채널은 액체-기체 계면의 압력강화를 유도하여 안정적인 확산이 이루어지도록 한다. 교차유로의 폭은 확산채널의 깊이와 함께 확산속도를 결정하는 것으로 2~50 μm 범위인 것이 바람직하다. 폭이 너무 넓다면 압력강하 효과가 줄어들어 유체의 불안정성으로 인해 농도구배가 빠른 시간에 평형 상태로 도달하여 추후 검출에 어려움이 있을 수 있고, 반대로 폭이 너무 좁다면 확산에 소요되는 시간이 너무 오래 걸려 검출에 시간이 너무 많이 소요될 수 있다.
- [0014] 제2미세유로는 검출채널의 한쪽 면에서만 제1미세유로와 교차하도록 할 수도 있으나, 동일 시간에서 검출채널의 폭방향(즉, 도 4의 a-a' 방향)의 농도구배가 더욱 균일하게 이루어질 수 있도록 하기 위해서 도 2에 도시된 바와 같이 상기 제2미세유로는 제1미세유로의 양측에서 T형으로 교차하며, 상기 확산채널은 검출채널과 제2미세유로의 사이 양측에 한 쌍 존재하는 것이 더욱 바람직하다. 검출채널의 폭방향의 농도구배를 균일하게 하기 위해서는 검출채널의 폭은 10~200 μm 인 것이 바람직하다. 검출채널의 폭이 너무 넓다면 폭방향 농도구배가 균일하지 못할 것이며, 반대로 폭이 너무 좁다면 시간에 따른 농도구배가 너무 빠르게 일어나 검출에 어려움이 있을 수 있다. 그러나, 각 실험에 따라 교차유로의 폭과 확산채널의 깊이, 검출채널의 폭의 상호관계에 의해 시간에 따른 농도구배가 결정되는 것이므로 각 실험에 따라 적절한 범위를 설정할 수 있는 것으로 상기 기재된 범위를 벗어나는 것을 제외하는 것은 아니다.
- [0015] 또한, 확산채널까지 제1용액을 효과적으로 채울 수 있도록 하기 위해서 모세관 작용이 효과적으로 작동할 수 있도록 상기 기판은 제1용액에 대한 접촉각이 0~50도인 친수성 물질로 이루어지고, 상기 몰드는 제1용액에 대한 접촉각이 90~110도인 소수성 물질로 구성된 것이 더욱 바람직하다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 미세유체장치를 이용하며, (A) 제1수용부와 제1미세유로에 제1용액으로 박테리아용액을 채우는 단계; (B) 제2수용부와 제2미세유로에 제2용액으로 주화성을 측정하고자 하는 시료용액을 채우는 단계; 및 (C) 검출채널의 소정 영역에서 시간에 따른 박테리아의 개체수의 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석 방법에 관한 것이다.
- [0017] 상기 (C) 단계의 소정 영역이라 함은 주화성 관측 시 동일 영역에서의 박테리아 개체수를 측정하기 위하여 임의로 정하는 영역으로 그 크기나 위치 등에 제한이 있는 것은 아니다. 그러나, 도 5에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 미세유체장치에서 검출채널 중 교차유로 인접영역에서 제2용액의 농도가 최고값을 나타내므로, 상기 측정영역은 교차유로 인접영역에 설정되는 것이 바람직하다.
- [0018] 상기 박테리아는 그 자체로 사용하여 개체수를 측정할 수도 있으나, 예를 들면 형광 표지와 같이 표지된 박테리아를 사용하여 개체수를 측정할 수도 있다. 특히 표지된 박테리아를 사용하는 경우에는, 박테리아 용액으로 두 가지 종류 이상의 박테리아의 혼합 용액을 사용하면서 상기 박테리아는 서로 다른 표지물질로 표지한다면 두 가지 이상의 박테리아의 주화성을 동시에 측정할 수 있다. 예를 들어, 제1박테리아는 녹색형광으로 표지하고, 제2박테리아는 적색형광으로 표지하면 각각의 박테리아가 서로 다른색의 형광을 나타내므로 두가지의 박테리아의 주화성을 동시에 측정할 수 있을 뿐 아니라 상대적인 주화성의 정도도 측정이 가능하다.
- [0019] 상기 (C) 단계의 측정결과 시간에 따라 박테리아의 개체수가 증가하였다면(양성 주화성을 나타냈다면) 제2용액의 시료는 유인물질로 작용한 것이고, 박테리아의 개체수가 감소하였다면(음성 주화성을 나타냈다면) 제2용액의 시료는 기피물질로 작용한 것이다.
- [0020] 본 발명의 미세유체장치는 추가적으로 제3용액이 수용되는 제3수용부와 제3배출구가 연결된 제3미세유로, 제1미세유로와 제3미세유로가 교차하는 제2검출채널, 제2검출채널과 제3미세유로 사이에 형성된 제2확산채널을 갖도록 구성할 수 있다. 상기 제2확산채널은 전술한 확산채널과 같은 깊이 조건을 만족하며 교차유로와 공기채널 역시 동일한 조건으로 형성되어 있다. 상기 장치에 의하면, 제2용액과 제3용액을 동시에 주입하고 검출채널과 제2검출채널을 동시에 관측하는 것에 의해 한번의 실험으로 제2용액 및 제3용액의 유인강도 또는 기피강도를 상대적으로 평가할 수 있다.
- [0021] 또는 상기 (C) 단계의 측정으로부터 시간 당 박테리아 개체수의 변화(개체수/시간)를 계산하고 주화성 지수로 정의하여 유인강도 또는 기피강도를 정량화할 수 있다. 상기 주화성 지수가 양의 값을 가지면 주화성 또한 양의 주화성을 갖는 것을, 주화성 지수가 음의 값을 가지면 음의 주화성을 갖는 것을 알 수 있으며, 그 절대값이

클수록 해당 시료의 유인강도 또는 기피강도가 크다.

[0022] 통상은 하나의 물질은 유인물질로 또는 기피물질로서 작용하며 시간에 따른 박테리아 개체수의 그래프가 직선을 나타내지만, 농도에 따라 박테리아의 유인물질로 작용하거나 기피물질로 작용하여 양쪽 성질을 모두 나타내는 물질의 경우에는 시간에 따른 박테리아 개체수의 그래프가 도 8과 같이 꺾인선을 나타낸다. 이 경우, 검출채널에서의 농도구배에 대한 표준곡선을 이용하면 시간 당 박테리아 개체수의 변화가 0인 점으로부터 유인물질 또는 기피물질로 작용하게 되는 임계농도를 구할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 이상과 같이 본 발명의 미세유체장치에 의하면 유체의 흐름에 의한 영향을 배제할 수 있으면서도, 미세유체장치 내에 막이나 히드로겔을 장착하지 않고도 농도구배를 형성할 수 있어, 빠르고 재현성있게 박테리아의 주화성을 정성 또는 정량적으로 검출할 수 있다.

[0024] 또한 본 발명에 의해 다양한 종류의 화학물질에 대한 박테리아의 주화성을 정량적으로 분석하여 주화성과 관련된 미생물 생태계, 신진대사, 생물학적 정제, 병의 발병 등의 연구에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 미세유체장치의 검출채널과 확산채널 영역의 제작과정을 보여주는 모식도.
 도 2은 본 발명의 일 실시예에 의한 전체 미세유체장치의 구조와 검출채널과 확산채널 영역의 세부구조를 보여주는 도면.
 도 3은 본 발명의 미세유체장치의 작동 과정을 보여주는 모식도.
 도 4는 본 발명의 미세유체장치의 검출채널에서 시간에 따른 농도구배가 형성됨을 보여주는 사진 및 그래프.
 도 5는 본 발명의 미세유체장치의 검출채널에서 위치에 따른 농도구배가 형성됨을 보여주는 사진 및 그래프.
 도 6은 본 발명의 일 실시예에 의한 박테리아의 분석결과를 보여주는 사진 및 그래프.
 도 7은 본 발명의 일 실시예에 의해 여러 가지 시료에 대한 박테리아의 주화성 정도를 정량한 결과를 보여주는 그래프.
 도 8은 본 발명의 실시예에 의해 유인물질과 기피물질의 성질을 동시에 갖는 시료에 대한 박테리아의 주화성 분석결과를 보여주는 사진 및 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하 첨부된 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.

[0027]

[0028] 실시예 1 : 주화성 분석을 위한 미세유체장치의 제조

[0029] 미세유체장치는 통상의 소프트 식각법(soft lithography)에 의해 제조하였다.

[0030] 보다 구체적으로 먼저 검출채널 형성을 위해 실리콘 웨이퍼 위에 파지티브형 감광제(AZ 4330, Clariant Ltd., Seoul, Korea)를 고르게 도포한 후, 4,000rpm으로 30초 동안 스핀코팅하여 10 μ m 높이로 코팅하였다. 감광제에 도 1의 a 음각된 형태에 해당하는 마스크를 통해 UV를 조사한후 경화되지 않은 감광제를 제거하여 보호층(protective layer)을 형성하였다. 이후 보호층이 형성된 실리콘 웨이퍼를 deep silicon etcher (SLR-770-10R-B, Plasma-Therm Inc., USA)를 이용하여 2 μ m 높이만큼 식각하였다. 보호층으로 남아있는 파지티브형 감광제를 제거하여 도 1의 a와 같은 형상이 양각된 실리콘 웨이퍼를 얻었다. 도 1의 a1은 도면 a의 평면도이다. 도 1은 검출채널 및 확장채널의 구조를 세부적으로 확인할 수 있도록 검출채널과 확장채널 및 일부 제2미세유로

부분만을 도시한 것으로 실제의 실리콘 웨이퍼는 사방 폭과 길이방향으로 확장되어 있다.

- [0031] 상기 실리콘 웨이퍼 상에 다시 네가티브형 감광제 (SU-9, MicroChem, USA)를 deep silicon etcher에 의해 식각된 영역으로부터의 높이가 30 μm 가 되도록 코팅하였다. 도 2의 좌측에 있는 미세유로의 형상을 갖는 마스크를 통해 UV를 조사하여 이용하여 선택적으로 경화를 한 후, 경화되지 않은 감광제를 제거하였다. 도 2의 좌측 도면에서 사각형으로 표시된 부분이 도 1의 (b)에 확대 도시된 영역이다. 도 1의 b에서 흰색으로 도시된 형상이 경화된 네가티브형 감광제에 의해 형성된 부분이다. 도 1의 b1은 b1의 평면도를 투시도의 형태로 나타낸 것이다.
- [0032] 이후, PDMS(Sylgard 184; Dow Corning, Midland, MI)의 base와 경화제의 10:1 (w/w) 혼합물을 제작된 마스터 몰드에 부어준 후 65°C에서 밤새 경화시켜 원하는 형상의 패턴을 갖는 PDMS 마이크로 몰드를 제작하였다.
- [0033] 상기 PDMS 마이크로 몰드와 미세유체 장치의 제작에 사용할 유리기판을 0.01% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, USA) 용액에 30분간 침지하여 표면개질한 후 증류수로 세척하였다. 표면개질된 마이크로 몰드와 유리기판을 산소 플라즈마(PDC-002, Harrick, USA) 처리를 통해 붙여 미세유체 장치를 제작하였다. 제1수용부와 제2수용부 및 제1배출구와 제2배출구는 바이오피스 펀치를 사용하여 형성하였다. 도 1의 c는 미세유체 장치 중 도 2의 좌측 도면에서 사각형으로 표시된 부분의 모식도이며, 도 2의 우측은 이미지 사진과 단면도이다. 도 2에서 제2미세유로의 폭은 500 μm , 검출채널의 폭은 90 μm , 교차유로의 폭은 20 μm 이다.
- [0034] **실시예 2 : 미세유체 장치 채널에서의 농도구배 확인**
- [0035] 형광 염료를 이용하여 실시예 1에서 제조한 미세유체 장치의 검출채널에서 농도구배가 생성되는 것을 확인하였다.
- [0036] 먼저, 상단의 제1수용부를 통해 제1미세유로에 HEPES(N-2-hydroxyethyl- piperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid) 완충용액(10mM, pH 7.0)을 주입하였다. 검출 채널에 버퍼 용액이 채워지면, 하단의 제2수용부를 통해 100 μM 농도의 fluorescein을 주입하고 역상 현미경(NIKON, TE2000-U, Japan)에 장착된 CCD 카메라(Coolsnap cf, Photometrics, AZ, USA)를 이용하여 검출 채널에서 시간의 변화에 따른 형광의 변화를 관측하여 도 4에 도시하였다.
- [0037] 도 4의 좌측은 시간에 따른 형광 이미지 사진이며, 우측은 얻어진 이미지로부터 검출채널의 횡방향 단면 중 a-a' 영역을 line profiling 방법을 통해 형광 강도를 산출하고 산출된 형광 농도를 시간에 대한 그래프로 나타낸 것이다. 도 4로부터 시간에 따라 형광의 강도가 증가하여, 10분 정도면 원래 fluorescein 용액의 농도인 100 μM 로 포화상태에 도달함을 알 수 있었다.
- [0038] 도 5의 좌측은 시료의 교차 15분 후 형광이미지 사진이며, 우측은 교차채널로부터 제1수용부 방향인 종방향 a-a'에서의 농도구배를 보여주는 그래프이다. 도 5로부터 검출채널의 교차유로 영역에서 형광이 최대값을 가지며, 제1수용부 방향으로 선형적인 농도구배가 이루어짐을 확인할 수 있다.
- [0039] 이상의 결과로부터 본 발명에 의한 미세유체 장치에서는 통상 30분 이상이 소요되는 기존의 막 또는 히드로겔을 이용한 주화성 측정장치에서 보다 빠른 시간 내에 농도구배가 형성됨을 확인할 수 있었다.
- [0040] **실시예 3 : 미세유체 장치를 사용한 박테리아의 주화성 분석**
- [0041] 1) 유인물질과 기피물질 각각에 대한 주화성 분석
- [0042] 상기 실시예 1에서 제조한 미세유체 장치를 이용하여 녹색형광을 나타내는 GFP를 발현하는 *Pseudomonas aeruginosa*의 주화성을 측정하였다.
- [0043] *P. aeruginosa* PA01(wild-type strain)(영남대학교 생물공학실험실에서 제공받아 사용)에 전기천공법(electroporation)에 의해 녹색형광을 발현하는 플라스미드 pMRP9-1(영남대학교 생물공학실험실에서 제공받아 사용)을 도입하고 carbenicillin(200 $\mu\text{g/ml}$)을 포함하는 Lubria Bertani(LB) 배지에서 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양된 *P. aeruginosa*는 원심분리를 하고 3번 세척한 후 HEPES 완충용액에 O.D._{600nm} 0.1의 농도로 분산 시켰다.
- [0044] 실시예 1에서 제조한 미세유체 장치의 제1수용부에 상기 *P. aeruginosa* 용액을 주입하여 검출 채널에 박테리아

용액이 채워지도록 하였다. 이후, 제2수용부를 통해 주화성을 평가할 화학물질을 주입한 후, 역상 현미경(NIKON, TE2000-U, Japan)에 장착된 CCD 카메라(Coolsnap cf, Photometrics, AZ, USA)를 이용하여 검출 채널에서 두 유체가 만나는 시점부터 5초 단위로 시간의 변화에 따른 형광의 변화를 관측하였다. 도 6은 화학물질로 각각 1%(w/v) 펩톤 또는 1mM FeCl₃ 용액을 사용한 결과의 이미지 사진(a, c)과 펩톤과 FeCl₃에 대한 주화성 그래프(b, d)이다. 검출 영역은 도 6의 이미지 사진에서 사각 블록으로 표시된 41μm×63μm 영역을 대상으로 하였다. 주화성 그래프는 여러 가지 농도에서 시간에 따른 검출 영역의 박테리아 수(내부 그래프)와 상기 그래프의 기울기(단위 시간당 박테리아 개체수의 변화)를 주화성 지수(chemotaxis index)로 정의하여 농도에 따른 주화성 지수(외부 그래프)를 도시하였다. 주화성 지수가 양의 값이면 해당 화학물질이 유인물질임을, 주화성 지수가 음의 값이면 해당 화학물질이 기피물질임을 나타낸다.

[0045] *P. aeruginosa*는 유인물질인 peptone의 농도가 0.010 ~ 0.1%인 경우에는 주화성 지수가 점차 증가하였으며, 0.1% 이상의 농도에서는 포화상태에 도달함을 나타내었다. 반대로, 기피물질인 FeCl₃에 대해서는 농도가 증가함에 따라 Chemotaxis index가 감소하였다.

[0046] 2) 유인물질에 대한 주화성의 비교

[0047] 화학물질로 아스파르트산(Asp), 루이신(Leu) 또는 메티오닌(Met)을 각각 사용한 것을 제외하고는 1)과 동일한 방법에 의해 *P. aeruginosa*의 주화성을 측정하고, 10mM 농도의 각각의 아미노산에 대하여 시간에 따른 박테리아 수의 변화 주화성 지수(I_c)와 함께 도 7에 도시하였다.

[0048] 도 7에서 *P. aeruginosa*에 대해 세가지 아미노산 모두가 유인물질로 작용하며, 그 중 아스파르트산의 유인력이 가장 강력한 것을 확인할 수 있었다.

[0049]

[0050] 3) 농도에 따라 유인물질과 기피물질의 특성을 갖는 화학물질에 대한 주화성 분석

[0051] 메틸아스파르트산(α-methyl-DL-aspartic acid, Methyl-Asp)과 숙신산(succinic acid)에 대하여 *P. aeruginosa*의 주화성을 검정하였다. 화학물질로 메틸 아스파르트산 또는 숙신산을 사용한 것을 제외하고는 1)과 동일한 방법에 의해 *P. aeruginosa*의 주화성을 관측하고 그 결과를 도 8에 도시하였다.

[0052] 도 8의 a는 10mM 메틸 아스파르트산을 사용하였을 때 박테리아의 시간에 따른 이동을 보여주는 형광 이미지이며, b와 c는 메틸 아스파르트산 및 숙신산 각각에 대하여 5mM 및 10mM 농도에서 시간에 따른 박테리아 수의 변화를 나타내는 그래프이다. 흔히 유인 또는 기피물질로만 정의되었던 화학물질이 주를 이루었지만, 이렇게 하나의 화학물질이 유인 물질과 기피물질을 보이는 예는 드물다.

[0053] 도 8의 a로부터 초기 1~5분 동안에는 메틸아스파르트산의 농도가 높은 쪽으로 이동을 하여 유인물질의 성질을 나타내지만 6분 이상의 시간대에서는 기피물질의 특성을 확연히 나타냄을 알 수 있었다. 정량적으로는 도 8의 b에서 *P. aeruginosa*에 대해 5mM 메틸아스파르트산은 유인물질로만 작용하였으나, 10mM 메틸아스파르트산은 5.7분 이하의 시간에서는 유인물질의 성질을 보이다가 5.7분 이상의 시간에서는 기피물질의 성질을 나타내었다. 이는 시간에 따른 농도결과와 비교하였을 때 8.77mM의 농도에 해당하는 시간으로, 메틸아스파르트산이 8.77mM 이하의 농도에서는 유인물질의 성질을, 8.77mM 이상의 농도에서는 기피물질의 성질을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0054] 마찬가지로 숙신산에 대한 도 8의 c의 그래프로부터 대략 4.75~4.83mM의 농도범위에서 박테리아의 주화성이 변화되고 있음을 알 수 있다. 즉, 5mM과 10mM에서 박테리아의 주화성을 분석한 결과 각 농도에서 유인물질에서 기피물질로 변화되는 시간이 다르게 나타났으며, 이를 농도변화와 연관시켜 본 결과 변화되는 농도가 비슷하게 나타나고 있었다.

[0055] 따라서, 본 발명의 미세유체 장치에 의하면 박테리아의 주화성과 관련된 유인물질과 기피물질의 특성을 정량화할 수 있을 뿐만 아니라, 유인물질과 기피물질의 성질을 동시에 관찰 할 수 있다.

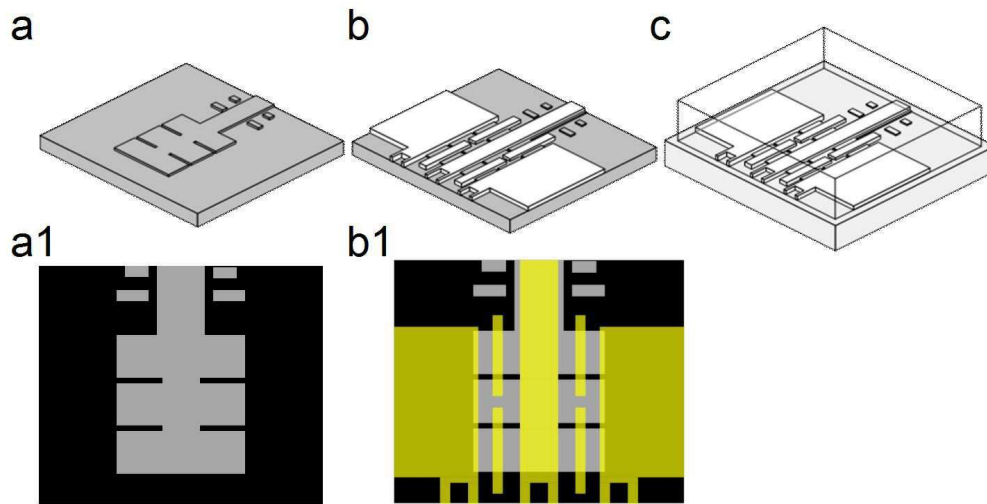
부호의 설명

[0056]

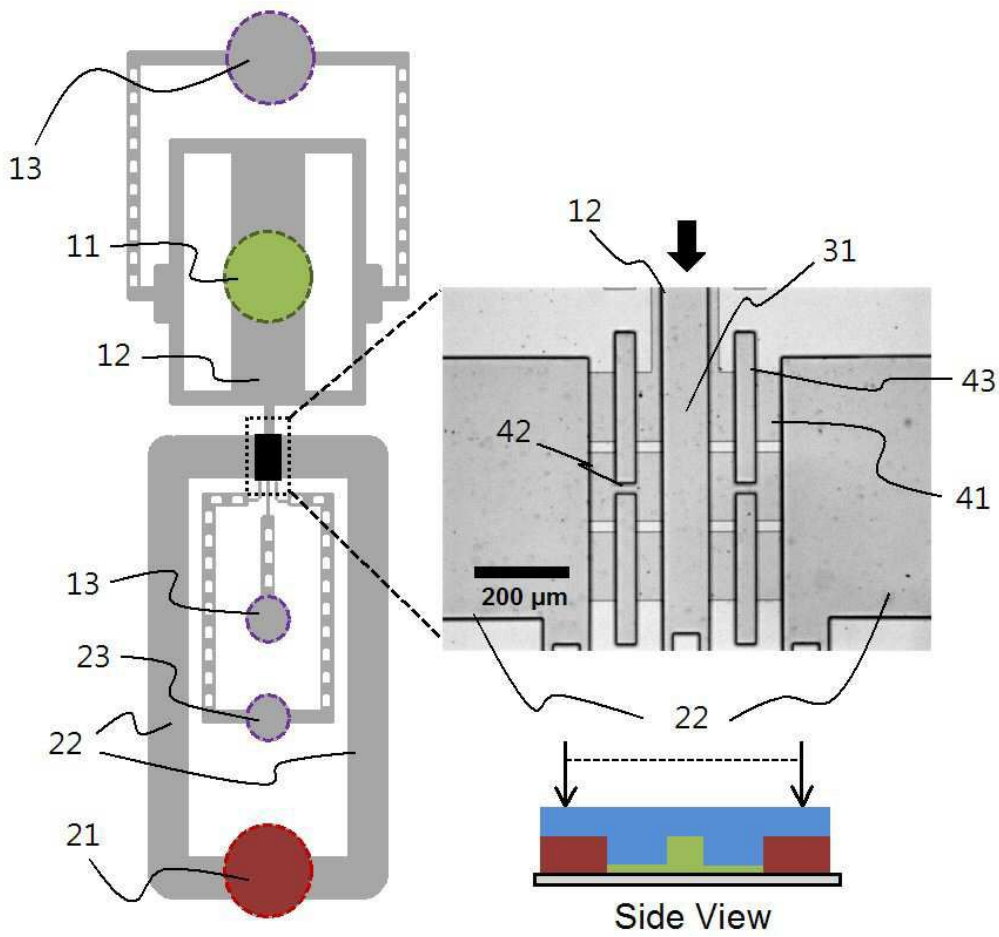
11 : 제1수용부	12 : 제1미세유로	13 : 제1배출구
21 : 제2수용부	22 : 제2미세유로	23 : 제2배출구
31 : 검출채널		
41 : 확산채널	42 : 교차유로	43 : 공기채널
51 : 기판		
61 : 몰드		

도면

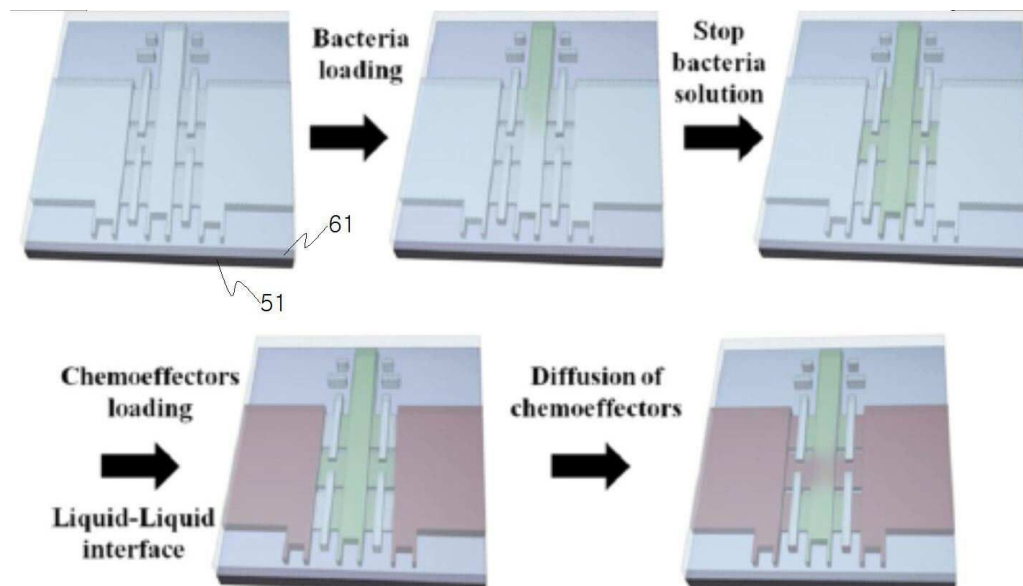
도면1



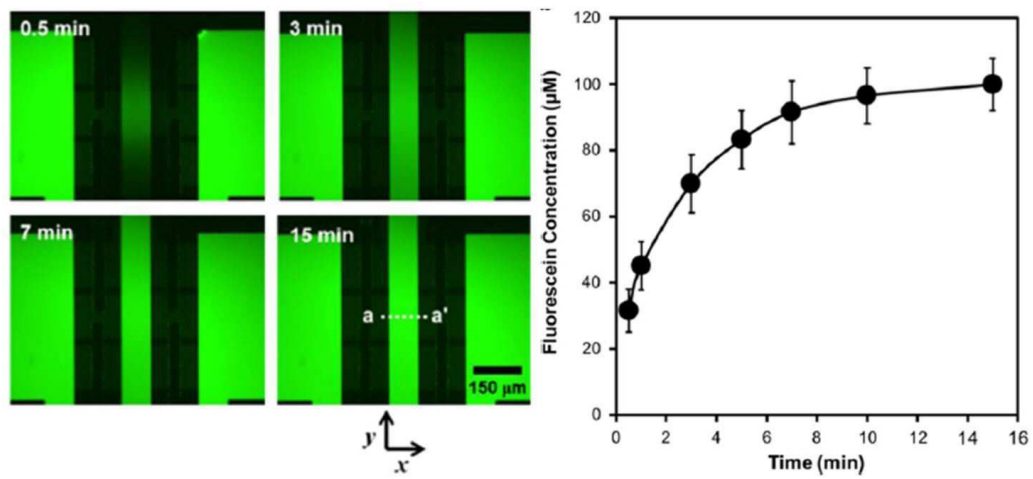
도면2



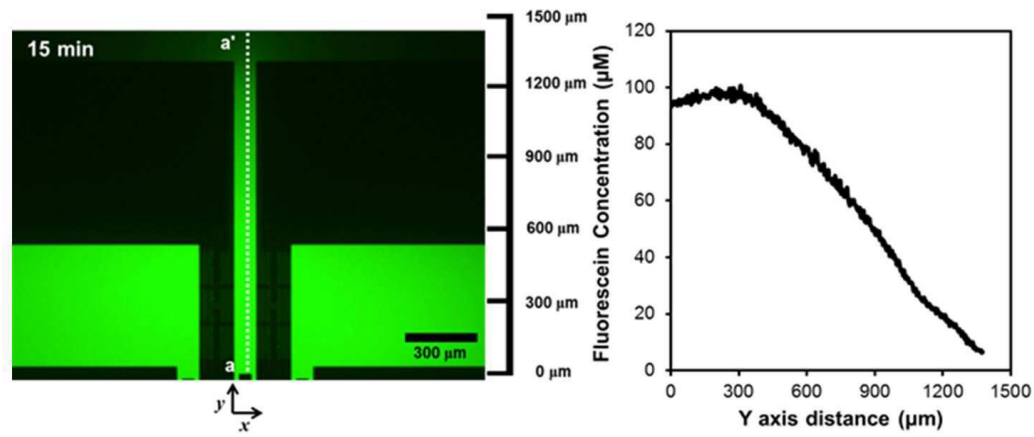
도면3



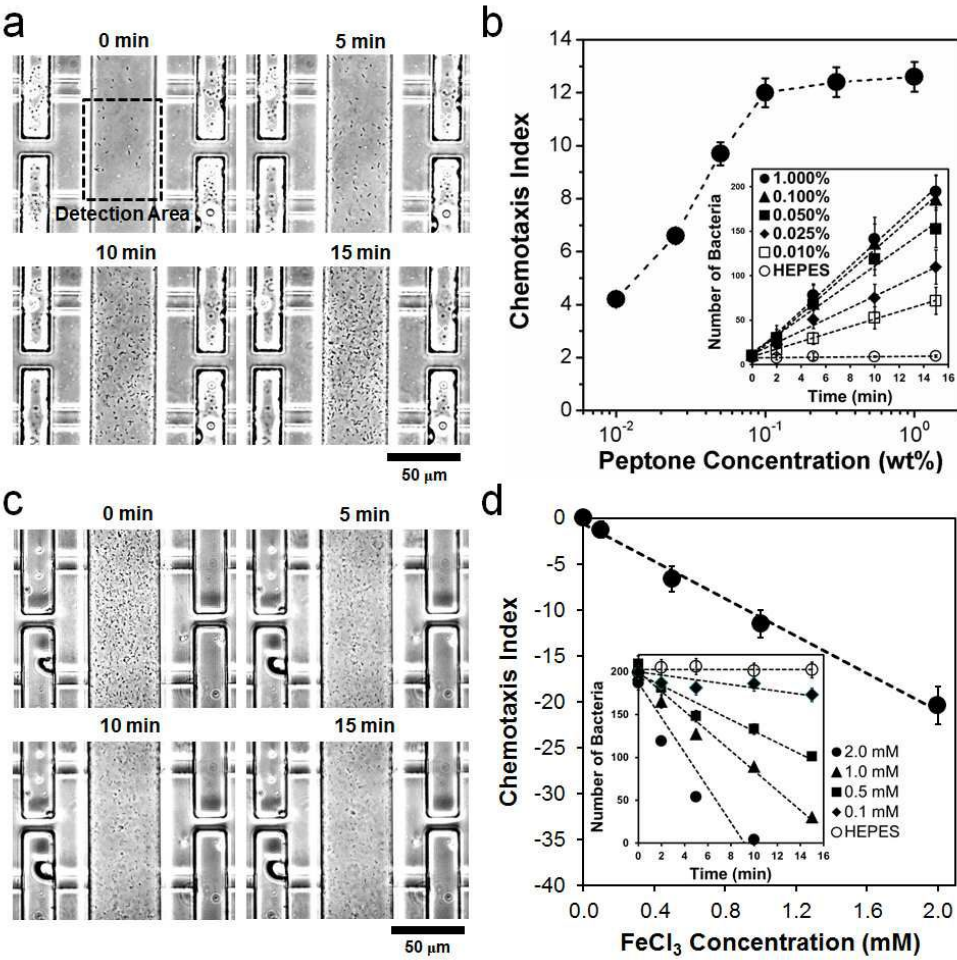
도면4



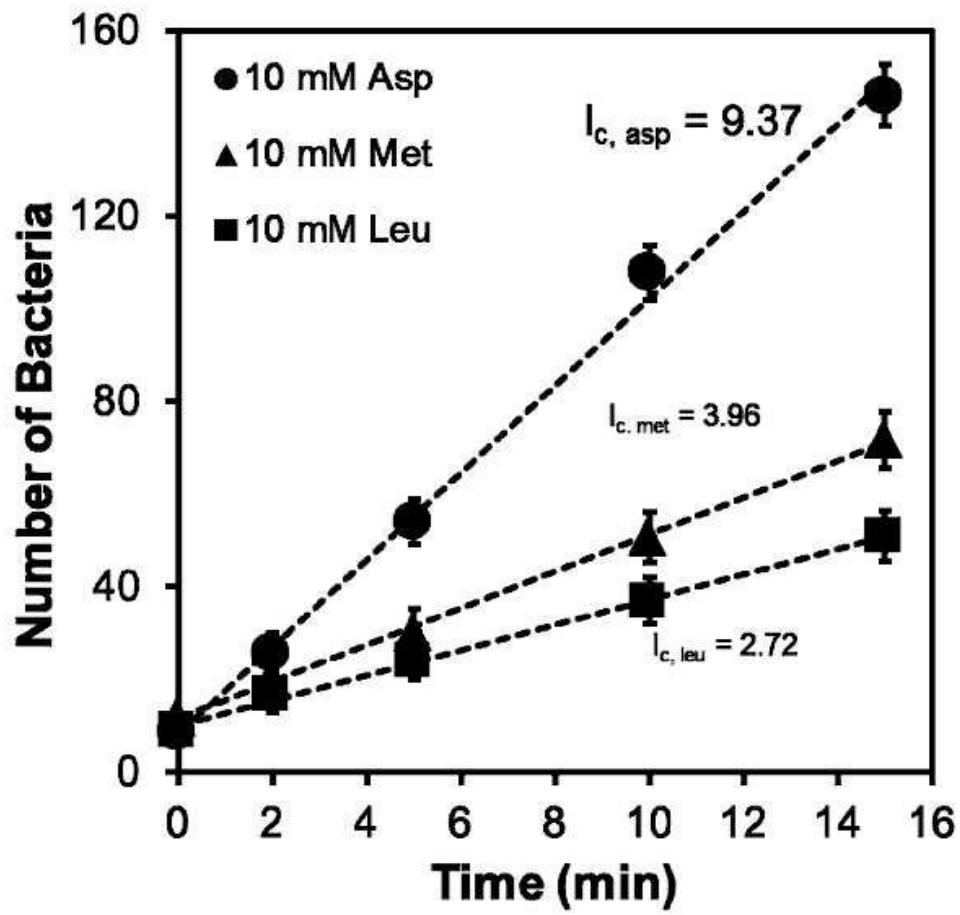
도면5



도면6



도면7



도면8

