

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0050253 (43) 공개일자 2012년05월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/04 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)	(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)	
(21) 출원번호 10-2010-0111674	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2010년11월10일	이창수	
심사청구일자 2010년11월10일	대전광역시 서구 둔산로 223, 청솔아파트 6동 1106호 (둔산동)	
	최창형	
	대전광역시 유성구 반석서로 109, 반석마을 7단지 707동 904호 (반석동)	
	김종민	
	대전광역시 서구 가장로 106, 래미안 아파트 117동 1504호 (가장동)	
	(74) 대리인	
	김원준	

전체 청구항 수 : 총 10 항

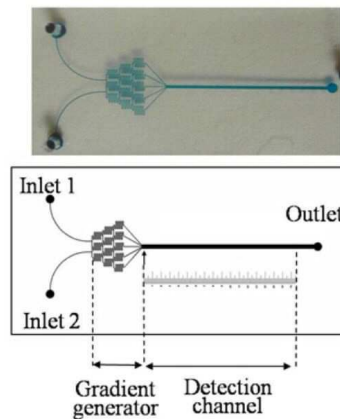
(54) 발명의 명칭 생물막의 시료 감응성 측정 방법 및 장치

(57) 요약

본 발명은 생물막 상태의 세균에 대한 시료 감응성을 빠르고 간편하며 재현성있게 측정할 수 있는 생물막의 시료 감응성 측정 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (A) 미세유로에 세균의 생물막을 형성하는 단계; (B) 상기 생물막이 형성된 미세유로에 횡단면측으로 시료 농도가 구배지도록 시료를 주입하며 생물막을 배양하는 단계; 및 (C) 상기 배양된 생물막의 형성 억제여부를 검출하는 단계;를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법에 관한 것이다.

또한 본 발명은 상기 방법에 의해 생물막의 시료 감응성을 측정할 수 있는 장치에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

- (A) 미세유로에 세균의 생물막을 형성하는 단계;
(B) 상기 생물막이 형성된 미세유로에 횡단면측으로 시료 농도가 구배지도록 시료를 주입하며 생물막을 배양하는 단계; 및
(C) 상기 배양된 생물막의 형성 억제여부를 검출하는 단계;
를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법.

청구항 2

- 제 1 항에 있어서,
(C) 단계 이후에, (D) 검정곡선으로부터 상기 (C) 단계에서 검출된 생물막의 박멸된 지점의 시료농도를 계산하여 최소 생물막 박멸농도(MBEC)를 구하는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법.

청구항 3

- 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,
상기 (A) 단계는,
(a) 미세유로에 세균을 부착시키는 단계;
(b) 미세유로에 부착되지 않은 세균을 세척하는 단계; 및
(c) 부착된 세균을 배양하여 생물막을 형성하는 단계;
를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법.

청구항 4

- 제 3 항에 있어서,
상기 시료는 항생제인 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법.

청구항 5

- 제 3 항에 있어서,
상기 시료로 산, 알칼리, 산화제 또는 환원제를 사용하여 생물막에 대한 환경요인의 영향을 평가하는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법.

청구항 6

- 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,
상기 (C)단계에서 생물막의 형성 억제여부 검출은 광학현미경에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료감응성 측정방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 세균은 표지된 세균인 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 표지는 형광물질, 자기입자, 방사선 동위원소 또는 양자점을 사용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법.

청구항 9

두 개의 주입구;

상기 주입구로 주입된 각 유체를 서로 다른 농도 구배를 갖는 복수개의 미세채널로 분리하는 구배형성영역;

구배형성영역을 통과하여 복수개의 미세채널로 분리된 유체가 합류하여 이동되는 검출채널; 및

검출채널을 통과한 유체가 배출되는 배출구;

를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정을 위한 미세유체 장비.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 검출 채널의 횡폭은 100~500 마이크로미터인 것을 특징으로 하는 미세유체 장비.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생물막 상태의 세균에 대한 시료 감응성을 빠르고 간편하며 재현성있게 측정할 수 있는 생물막의 시료 감응성 측정 방법 및 상기 방법에 의해 생물막의 시료 감응성을 측정할 수 있는 장치에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대부분의 세균은 인체 조직, 플라스틱, 금속, 의료 임플란트 재료 표면 등 다양한 표면에 부착하여 생물막(biofilm)이라 불리는 세균 집합체를 형성한다. 생물막은 자연환경에 일반적인 형태이며, 인간의 만성 세균성 감염의 원인이 된다.

[0003] 생물막 내에서 세균은 단백질, 핵산, 지질 및 엑소폴리사카라이드(exopolysaccharide)로 구성된 세포외고분자 물질(EPS, extracellular polymeric substances)이라는 불규칙하고 복잡한 네트워크 구조로 둘러싸여 있기 때문에 항생제나 외부 환경에 대한 저항성이 높다. 또한 EPS는 생물막에 기계적 안정성이나 높은 접착성과 점탄성을 제공한다. 반면 부유성 세균과 같이 생물막에 둘러싸이지 않은 세균들은 항생제나 외부 환경에 의한 영향을 더 많이 받게 된다.

[0004] 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 병원내 감염의 주요 원인이 되는 병원균으로 생물막 연구의 모델로 널리 이용되고 있다. 특히, 낭포성 섬유증 환자의 주요 사망원인의 하나로 녹농균에 의한 폐의 감염을 들 수 있는데, 이는 기도에 녹농균 생물막이 형성되는 것에 기인한다. 대부분의 낭포성 섬유증 환자는 만성 세균성 기도 감염

으로 고통받는데, 다중 약물에 대한 저항성을 갖는 생물막의 특성 상 이러한 감염을 방지하는 것은 매우 어렵다. 약물에 대한 저항성은 항생제가 생물막 매트릭스를 통해 침투하기가 어렵고, 생물막 세포의 성장속도가 느리며, 다중약물에 대한 배출 펌프(multidrug efflux pump)가 발현되어 항생제를 체외로 배출하는 것에 기인한다. 세균의 생물막의 형성은 병독성유전자(virulence gene)의 발현을 촉발하며, 면역세포의 식균 경로(phagocytic pathway)를 차단하는 것에 의해 숙주의 방어 메카니즘을 차단한다. 이러한 생물막의 방어 속성으로 인하여 혈관, 호흡기, 환자의 감염 조직과 같은 실제 동적 미소서식환경에서의 세균의 항생제에 대한 감응성은 부유 세포의 감응성과는 차이가 있게 된다. 한 연구에 의하면 부유상태의 세균과 비교한 경우 생물막의 항생제에 대한 내성이 100배를 초과한다고 한다.

[0005] 생물막 내에서 세균의 항생제 감응성을 측정하기 위한 여러 가지 방법들이 제안되어왔다. 예를 들어, 대한민국 공개특허 10-2008-81891에 게시된 CBD(Calgary Biofilm Device)는 생물막의 항생제 감응성을 스크리닝하고 최소 생물막 박멸농도(MBEC, minimal biofilm eradication concentration)를 측정할 수 있는 효율적인 방법이다. 그러나, 이 방법은 세균의 접종량의 크기에 의존할 수밖에 없어, 항생제 감응성의 결과에 크게 영향을 미친다(J. Bacteriol., 2001, 183, 6746). 또한, 상기 실험에서는 생물막의 생존가능한 세포를 계수하기 위해서 장비로부터 생물막을 회수하고, 회수된 생물막으로부터 세균을 분리하여 계수하여야만 한다. 생물막으로부터 분리된 세균은 생물막에 특이적으로 나타나는 생리적인 상태를 잃기 때문에 생물막의 항생제 감응성을 정확하게 측정하기 어렵다는 문제가 있다.

[0006] 이와 별도로, 전자기적 방사선 빔을 사용하여 검출된 방사선을 영상데이터로 검출하거나 배지 내에 전기장, 자기장 또는 전자기장 입자를 넣고 이를 통해 미생물 배양 배지의 점도를 측정함으로써 생물막의 형성 및 발달을 탐지하는 방법이 개발되었다. 이러한 방법은 균질한 점도의 배지에서만 측정이 가능하나, 세균의 배양 배지는 통상 유백광을 내고 흐리며 불투명하기 때문에 상기 방법으로는 배양 배지 내 생물막의 형성여부를 검정하기 어렵다. 따라서 시간, 비용 및 노력을 절감하면서도 보다 효율적이고 정량적으로 생물막의 시료에 대한 감응성을 재현성있게 측정할 수 있는 방법의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2008-81891호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) J. Bacteriol., 2001, 183, 6746.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 생물막의 시료에 대한 감응성을 간단한 공정으로 빠르게 측정하면서도 보다 정확하고 재현성있게 측정할 수 있는 방법을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한 본 발명은 환자의 실제 감염 부위와 비슷한 조건에서 정량적인 생리활성 데이터를 제공할 수 있도록 다양한 미소서식환경에서 생물막의 시료에 대한 감응성을 측정할 수 있는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 생물막의 시료 감응성을 측정할 수 있는 장비를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) 미세유로에 세균의 생물막을 형성하는 단계; (B) 상기 생물막이 형

성된 미세유로에 횡단면측으로 시료 농도가 구배지도록 시료를 주입하며 생물막을 배양하는 단계; 및 (C) 상기 배양된 생물막의 형성 억제여부를 검출하는 단계;를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정방법에 관한 것이다.

[0013] 본 발명의 측정방법에 의하면 농도에 따른 생물막의 형성 억제여부를 비교하는 것만으로도 간단하게 정성적으로 생물막의 시료 감응성을 측정할 수 있다. 더욱 나아가서는, 미세유로 내의 시료의 농도구배에 대한 검정곡선으로부터 상기 (C) 단계에서 생물막이 박멸된 지점의 시료농도를 계산하여 최소 생물막 박멸농도(MBEC)를 구하는 것으로 정량적으로 생물막의 시료 감응성을 측정하는 것이 가능하다. 본 발명에 의하면, 하나의 시료에 대해 여러 가지 농도에 대해서 각각의 실험을 하지 않고 한 번의 실험만으로도 생물막의 형성과 in-situ로 시료 농도에 따른 생물막의 감응성을 간단하고 재현성있게 측정할 수 있다.

[0014] 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.

[0015] 세균의 부착, 세척 및 배양을 위한 세균 현탁액, 세척액 및 배양액의 유속은 미세유로의 폭, 재질, 유체의 종류 등에 따라 달라질 수 있으나, 현탁액 < 배양액 < 세척액의 순으로 유속이 빠른 것이 효율적임은 당연하다. 하기 실시예에서의 유속은 사전 실험에 의해 결정된 것으로, 유사한 조건에서는 이를 참고하여 수치를 최적화할 수 있다. 세균의 부착 시 세균 현탁액의 유속이 너무 빠르면 세균이 효과적으로 부착되지 못하게 된다. 세척액은 유속이 너무 느리면 부유 세균이나 약하게 결합된 세균을 효과적으로 제거할 수 없으며, 유속이 너무 빠르면 미세유로에 부착되어 있는 세균을 박리시킬 수 있다. 배양액의 유속은 생물막의 형성에 영향을 미치게 된다. 배양액이 너무 빠른 속도로 유입되면 생물막에 전단응력이 작용하여 형성되는 생물막이 박리될 수 있다.

[0016] 상기 생물막이 형성된 미세유로에 횡단면측으로 시료 농도가 구배지도록 시료를 주입하며 생물막을 배양한 후 배양된 생물막의 형성억제여부를 검출하는 것에 의해 시료에 대한 생물막의 감응성을 측정할 수 있다. 상기 시료의 주입속도가 너무 느린 경우 미세유로 내에서 확산으로 인한 농도구배가 선형적으로 이루어지지 않을 수 있으므로 적절히 조절되어야 한다. 하기 실시예에서는 시료와 배지를 각각 0.1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 속도로 주입하였으나, 역시 미세유로의 폭, 재질, 유체의 종류 등에 의해 영향을 받으므로 각 실험조건에 적절하게 조절되어야 하는 것은 당연하다.

[0017] 상기 생물막의 형성 억제여부는 광학현미경을 통해 용이하게 검출할 수 있으나, 상기 세균에 표지가 되어 있다면 보다 용이하게 생물막의 형성정도를 측정하는 것이 가능하다. 하기 실시예에서는 형광을 발하는 유전자에 의해 재조합된 세균을 예로 들어 형광을 측정하는 것에 의해 생물막의 형성 억제여부를 검출하였지만, 이외에도 형광염료, 자기입자, 방사선 동위원소 또는 양자점과 같이 통상의 바이오 분야에서 표지물질로 사용되는 것에 의해 표지가 가능하다. 이때, 검출 방법은 표지 방법에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 하기 실시예는 녹농균을 대상으로 하였지만 녹농균에 본 발명의 방법이 한정되는 것은 아니며 생물막을 형성하는 세균이라면 모두에 이용될 수 있음은 당연하다.

[0018] 상기 시료는 좁은 의미에서는 항생제일 수 있다. 즉, 항생제를 시료로 하여 생물막의 시료 감응성을 측정하는 것에 의해 세균의 감염에 의한 질병을 치료하기 위해 효과적인 항생제의 개발이나, 유효 복용량을 산정하는 것이 가능하다.

[0019] 그러나 상기 시료는 항생제에 국한되는 것이 아니라, 산, 염기, 산화제 또는 환원제를 대상으로 할 수도 있다. 상기 시료에 대한 생물막의 감응성 측정에 의해 생물막의 형성에 미치는 환경적 요인을 효과적으로 평가할 수 있어, 생물막의 형성을 억제하거나 생물막을 안정되게 유지할 수 있는 환경을 조성하는 데 이용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 일양태는 생물막의 시료 감응성을 측정하기 위한 장치에 관한 것으로, 두 개의 주입구; 상기

주입구로 주입된 각 유체를 서로 다른 농도 구배를 갖는 복수개의 미세채널로 분리하는 구배형성영역; 구배형성 영역을 통과하여 복수개의 미세채널로 분리된 유체가 합류하여 이동되는 검출채널; 및 검출채널을 통과한 유체가 배출되는 배출구;를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 생물막의 시료 감응성 측정을 위한 미세유체 장비에 관한 것이다. 상기 구배형성영역은 두 개의 주입구에서 각각 주입된 시료와 이동상의 혼합에 의해 생성되는 농도구배가 검출채널에서 선형적으로 이루어질 수 있도록 하는 영역이다. 보다 구체적으로 각 주입구에서 주입된 시료와 이동상을 혼합하여 시료의 농도 구배가 이루어진 여러갈래의 흐름으로 나누어 주고, 이들이 검출채널에서 합류되게 하는 것에 의해 검출채널에서 시료의 농도구배가 선형적으로 이루어지게 된다. 구배형성영역의 구성에 대해서는 종래 기술을 참조하여 다양하게 구성하는 것이 가능하므로 본 발명에서는 구체적인 기재를 생략한다(N. L. Jeon, H. Baskaran, S. K. W. Dertinger, G. M. Whitesides, L. V. D. Water and M. Toner, Nat. Biotechnol., 2002, 20, 826.; P. Hung, P. Lee and L. P. Lee, Biotechnol. Bioeng., 2005, 89, 1.; J. Diao, L. Young, S. Kim, E. A. Fogarty, S. M. Heilman, P. Zhou, M. L. Shuler, M. Wu and M. P. DeLisa, Lab Chip, 2006, 6, 381.)

[0021] 상기 미세유로의 횡폭은 실험목적에 따라 적절한 범위로 설계할 수 있으나 100~500 마이크론인 것이 바람직하며, 200~300 마이크론인 것이 더욱 바람직하다. 미세유로의 폭이 너무 좁으면 세균이나 시료의 주입이 쉽지 않으며, 미세유로의 폭이 너무 넓으면 안정된 층류로 인한 농도구배의 형성이 어렵다. 또한 미세유로의 폭이 너무 넓어 현미경 검출 창(detection window) 범위를 벗어나게 되면 관찰이 번거롭게 되는 단점이 있다.

발명의 효과

[0022] 이상과 같이 본 발명에 미세유체 장비 및 생물막의 항생제 감응성 측정 방법에 의하면, 생물막의 형성과 항생제 감응성을 in-situ로 간단한 방법으로 재현성있게 측정하는 것이 가능하므로 항생제의 복용량 설정에 효율적으로 이용될 수 있다.

[0023] 또한 기존 항생제 뿐 아니라 신약의 개발단계에서도 유효 용량을 용이하게 측정할 수 있으므로 항생제의 합리적인 설계에 보다 정확한 정보를 제공할 수 있다.

[0024] 또한 본 발명은 항생제 뿐 아니라 생물막의 형성에 영향을 미치는 pH, 산화 스트레스(oxidative stress) 등의 환경적 요인에 대한 평가 역시 용이하게 실시할 수 있어 생물막의 형성을 억제하여 보다 위생적인 환경을 구축하거나, 혹은 생물막을 산업적으로 이용하는 폐수처리와 같은 분야에서는 생물막을 효율적으로 형성할 수 있는 환경을 보다 용이하게 구축할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일실시예에 의한 생물막의 항생제 감응성 측정을 위한 미세유체 장비를 보여주는 사진 및 모식도.

도 2는 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체 장비의 규격을 보여주는 설계도.

도 3은 도 1의 미세유체 장비의 검출채널에서 약품의 농도구배가 직선적으로 생성됨을 보여주는 그래프.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 의한 미세유체 장비에서 생물막의 형성과정을 보여주는 모식도.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 의한 미세유체 장비에서 생물막의 형성과정을 보여주는 형광현미경사진.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 의한 미세유체 장비에서 MBEC 값의 측정원리를 보여주는 모식도.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 의해 카나마이신에 대한 녹농균 생물막의 감응도 측정 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 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.

[0027] **실시예 1 : 미세유체 장비의 제작**

[0028] 미세유체 장비는 소프트 식각법(soft lithography)에 의해 도 1과 같이 두 개의 주입구(inlet)와 구배생성영역 (gradient generator), 검출채널(detection channel) 및 하나의 배출구를 갖는 미세유로를 갖도록 제작하였다.

[0029] 보다 구체적으로 실리콘 웨이퍼 위에 네가티브형 감광제(SU-8, Microchem Co., USA)를 고르게 도포한 후, 1,000rpm으로 스핀 코팅하여 40 μm 높이의 감광제를 올려주었다. 감광제에 도 1과 같은 미세유로 형상이 있는 마스크를 통해 UV를 조사하여 채널과 반대 형상을 갖는 마스터 몰드를 제작하였다. 도 1의 미세유로에서 검출 채널의 넓이는 300 μm , 이외의 미세 채널의 넓이는 50 μm 이며, 전체 미세채널의 규격은 도 2에 도시된 바와 같다.

[0030] 이후, PDMS(Sylgard 184; Dow Corning, Midland, MI)를 제작된 마스터 몰드에 부어준 후 65°C에서 4시간 경화시켜 원하는 형상의 미세유로를 가진 PDMS 몰드를 제작하였다. 이렇게 만들어진 PDMS 몰드에 유리 기판을 산소 플라즈마 처리를 통해 붙여 미세유체 장치를 제작하였다.

[0031] **실시예 2 : 생물막의 항생제 감응성 측정**

[0032] **1) 농도구배 검정곡선 작성**

[0033] 상기 실시예 1에서 제작한 미세유체 장비의 검출채널에서 화학물질의 구배가 일어나는 것을 시각화하여 확인하고, 농도구배에 대한 검정곡선(calibration curve)을 얻었다.

[0034] 실시예 1에서 제작된 미세유체장비의 각 주입구에 타이곤튜브(Tygon tube)를 연결하고, 각각의 튜브에는 마이크로시린지(Norm-Ject, Germany)를 연결하고 각각 시린지 펌프(Harvard Apparatus, USA)를 사용하여 마이크로시린지 내의 용액을 미세유로로 펌핑할 수 있도록 하였다. 상기 방법에 의해 한쪽 주입구에는 형광염료인 로다민 (Rhodamine) B 0.1 mM 용액을, 다른 쪽 주입구에는 PBS(phosphate buffer saline)을 각각 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}^{-1}$ 의 속도로 동시에 주입하였다.

[0035] 검출채널의 다양한 위치에서 로다민 B의 형광을 CCD 카메라(Coolsnap cf, Photometrics, USA)가 장착된 inverted fluorescence microscope, TE2000, Nikon, Japan)을 사용하여 측정하고 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3의 (a)는 검출채널의 길이와 채널 단면에서의 형광세기를 3차원 그래프로 도시한 것이며, 도 3의 (b)는 특정 검출채널의 특정길이에서 횡단면의 형광세기를 그래프로 도시한 것이다.

[0036] 실시예 1의 미세유체 장비를 통해 로다민 B와 PBS를 주입하면, 구배생성영역을 지나면서 로다민 B의 농도가 다른 다섯 갈래의 흐름으로 갈라져 검출채널로 연속적으로 유입되게 되므로, 검출채널의 횡단면에 로다민 B의 농도 구배가 생기게 된다. 도 3의 (a)와 (b)에서 볼 수 있듯이, 구배생성영역을 지난 다섯 갈래의 흐름이 합쳐지는 검출채널의 유입점(0 mm)에서는 다섯 갈래의 흐름에서 유입된 농도의 차이가 커브로 확연히 나타나지만, 검출채널을 통과함에 따라 농도구배가 선형적으로 변하게 된다. 이러한 농도구배는 검출채널의 끝 즉, 8 mm 위치까지 유지된다. 도 2의 (a)와 (b)에 의해 상기 실시예 1의 미세유체 장비에서 검출채널에 화학물질의 농도구배가 선형적으로 일어나는 것을 확인할 수 있으며, 상기 그래프를 검정곡선으로 유입되는 화학물질의 농도로부터 검출채널의 특정위치에서의 농도를 계산할 수 있다.

[0037] **2) 생물막의 형성**

[0038] 실시예 1에서 제작된 미세유체 장비의 미세채널에 *P. aeruginosa* PA01 wild type strain(ATCC number : 47085D-5)을 이용하여 생물막을 형성하였다.

[0039] Science Vol. 280 10 April 1998에 기재된 방법에 따라 녹색형광단백질(GFP)을 발현하는 plasmid pMRP9-1을 제조하고, 통상의 방법에 따라 상기 플라스미드를 도입하여 *P. aeruginosa* PA01를 형질전환하였다. 형질전환된 *P. aeruginosa* PA01를 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ carbenicillin이 함유된 LB(Luria-Bertani) 배지에서 선별하고, 37°C LB 배지에 접종하여 밤새 배양하였다. 배양된 세균을 5000 μg 로 원심분리하여 수확하고 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)로 두 번 세척한 후 세균의 농도가 1×10^9 cell/ml가 되도록 1 ml LB 배지에 다시 현탁하였다.

현탁액을 사용하여 미세유체 장비 내에 생물막을 형성하는 과정을 도 4에 도시하였다.

- [0040] 보다 구체적으로, 상기 실시예 1의 배출구에 타이곤튜브(Tygon tube)를 연결하고, 튜브에는 상기 세균 현탁액이 들어있는 마이크로시린지(Norm-Ject, Germany)를 연결하였다. 시린지 펌프(Harvard Apparatus, USA)를 사용하여 마이크로시린지 내의 세균 현탁액을 0.05 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 1분간 주입한 후 시린지 펌프를 끄고 10분간 정지하였다(도 3의 (a)). 이 과정에서 주입된 세균은 검출채널의 미세유로 표면에 부착되게 된다.
- [0041] 이후, 멸균된 PBS 완충액을 주입주 중 하나를 통하여 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 30분간 흘려주어 미세유로에 부착되어 있지 않거나 약하게 부착된 세균을 제거하였다(도 3의 (b)). 부착된 세균으로부터 생물막을 형성하기 위하여 주입구 중 하나를 통하여 LB 배지를 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 흘려주면서 24시간 배양하였다(도 4의 (c)).
- [0042] 생물막의 형성과정을 CCD 카메라(Coolsnap cf, Photometrics, USA)가 장착된 역상형광현미경(inverted fluorescence microscope, TE2000, Nikon, Japan)을 사용하여 시간별로 관찰하고 그 결과를 도 5에 도시하였다. 도 5를 참조하면, 배양 시작시(0 h) 부착되어 있는 세균이 시간이 경과함에 따라 성장하여(4 h), 12 h 후에는 세균 클러스터를 형성하고 24 h이 경과되면 미세유체 채널의 전체 기층(substratum)에 생물막이 형성되어 덮여있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0043] **3) MBEC 측정**
- [0044] 생물막에서 박테리아의 항생제 감응성을 측정하기 위하여 여러 가지 항생제에 대한 MBEC 값을 측정하였다. 생물막이 형성된 미세유체 장비에서의 MBEC 측정 원리를 도 6에 도시하였다.
- [0045] 카나마이신(Kanamycin, Km)을 예로 들어 MBEC 측정 방법을 설명한다. 전술한 2)에서 검출채널에 생물막이 형성된 미세유체 장비의 한쪽 주입구에는 카나마이신 용액을 다른 쪽 주입구에는 LB 배지를 각각 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 주입하였다. 실험의 정밀성을 높이기 위하여 카나마이신은 100, 200 또는 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 사용하여 별도로 실험하였다.
- [0046] 항생제를 30초간 흘려준 후 CCD 카메라(Coolsnap cf, Photometrics, USA)가 장착된 역상형광현미경(inverted fluorescence microscope, TE2000, Nikon, Japan)을 사용하여 형광강도를 측정하고 그 결과를 도 7에 도시하였다. 도 7의 (A) 사진에서 확인할 수 있듯이, 생물막이 형성된 검출채널에 카나마이신이 구배생성영역을 통하여 주입되면 카나마이신의 농도가 낮은 영역에서는 생물막이 유지되지만 항생제의 농도가 높은 영역에서는 생물막의 세균이 사멸되므로 형광이 약하게 나타나게 된다. (A)에서 화살표로 표시된 위치는 형광강도가 생물막이 없는 background의 형광강도와 동일하게 되는 위치를 표시하는 것이다. 화살표 위치의 카나마이신의 농도로부터 MBEC가 $57 \pm 4.7 \mu\text{l}/\text{ml}$ 임을 확인할 수 있었으며, 이는 여러 가지 카나마이신의 농도에 대해 측정한 값 모두에서 잘 일치하였다. 도 7의 (B)는 형광강도와 카나마이신의 농도를 채널 횡단면의 위치에 따라 도시한 그래프로 카나마이신의 농도가 진해짐에 따라 형광강도가 감소하는 것을 확인할 수 있다.
- [0047] 카나마이신 이외의 다른 항생제에 대해서도 상기 방법과 동일한 방법에 의해 MBEC를 측정하고 그 결과를 표 1에 나타내었다. 또한, 부유 세균에 대한 MIC 값과 비교하기 위하여 "Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines"에 따른 표준 이배 희석법에 의해 MIC 값을 측정하고(Can. J. Vet. Res., 2002, 66, 86) 그 값을 표 1에 함께 기재하였다. 표 1에서 측정한 모든 항생제에 대하여 MBEC값은 부유 세균에 대한 MIC 값도 높았으며, 본 발명에 의해 실제 생물막에서 세균의 항생제 감응성을 1회의 실험만으로도 간편하게 측정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

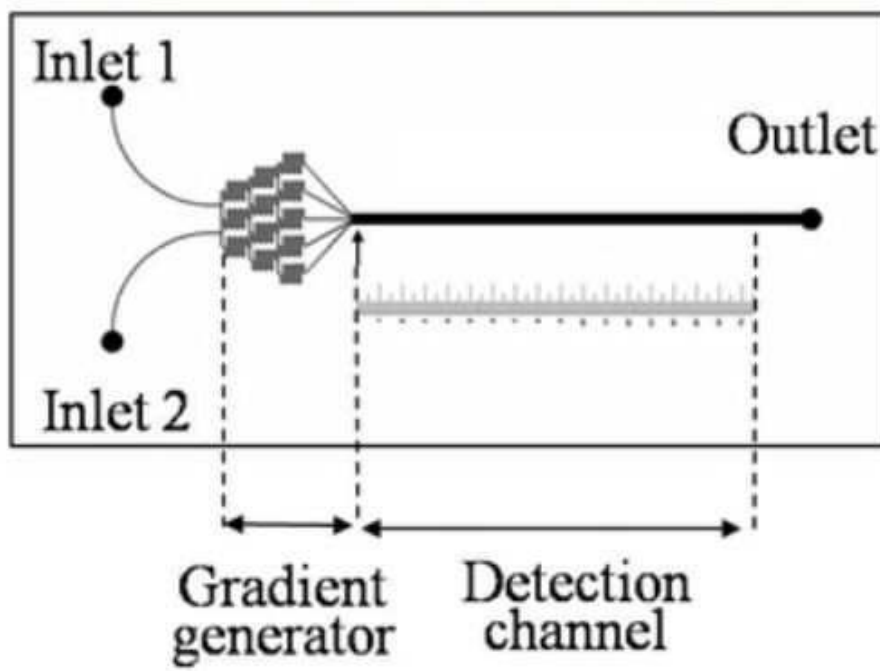
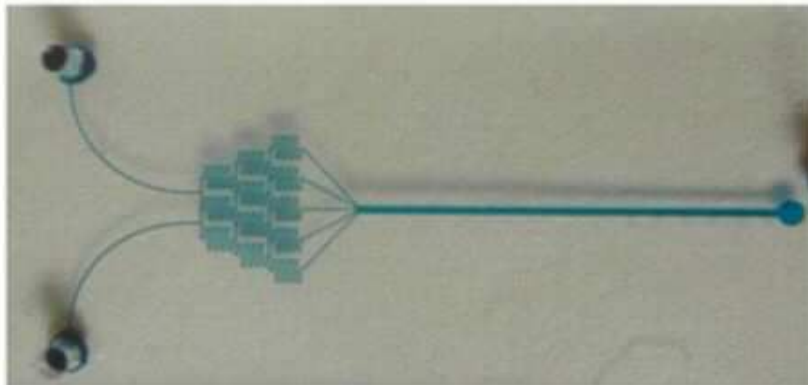
표 1

Antibiotics	Standard method ^a	Microfluidic method
	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MBEC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Aminoglycosides		
Amikacin	3.12	235 ± 3.9
Gentamicin	6.25	67 ± 1.6
Kanamycin	12.5	57 ± 2.7
Neomycin	6.25	165 ± 3.7
Streptomycin	25.0	46 ± 1.5
Tobramycin	6.25	53 ± 1.9
Paromomycin	25.0	35 ± 1.5
Tetracyclines		
Doxycycline	25.0	125 ± 3.7
Oxytetracycline	6.25	130 ± 3.1
Tetracycline	12.5	125 ± 3.6
Others		
Chloramphenicol	50.0	250 ± 4.5

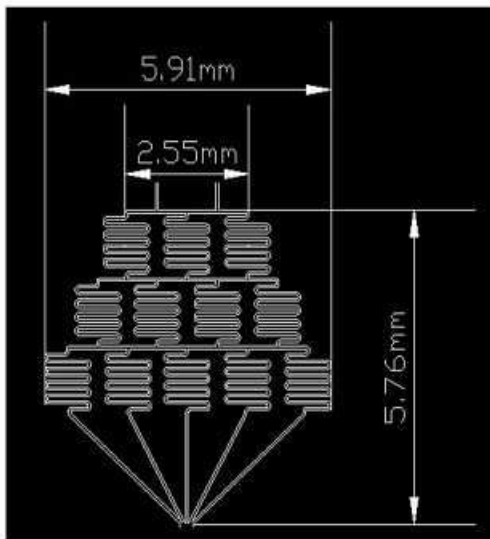
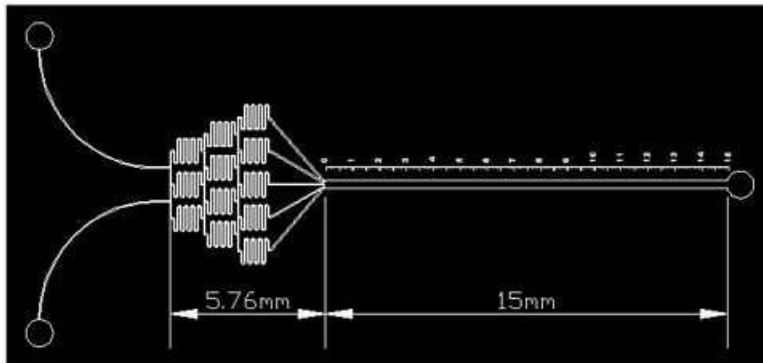
[0048]

도면

도면1

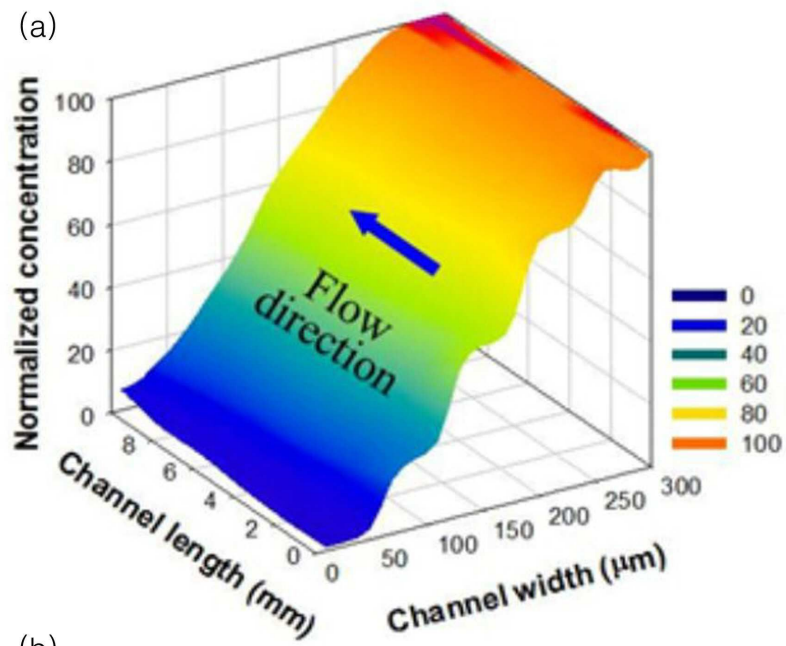


도면2

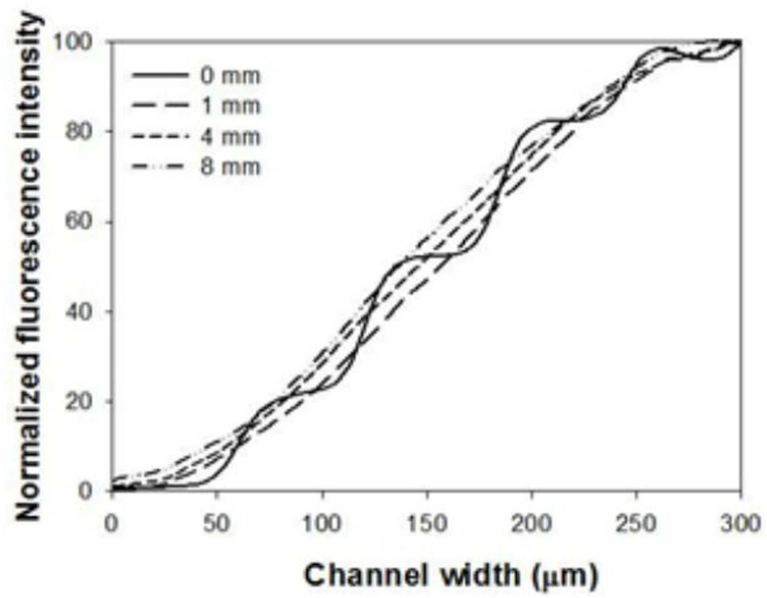


도면3

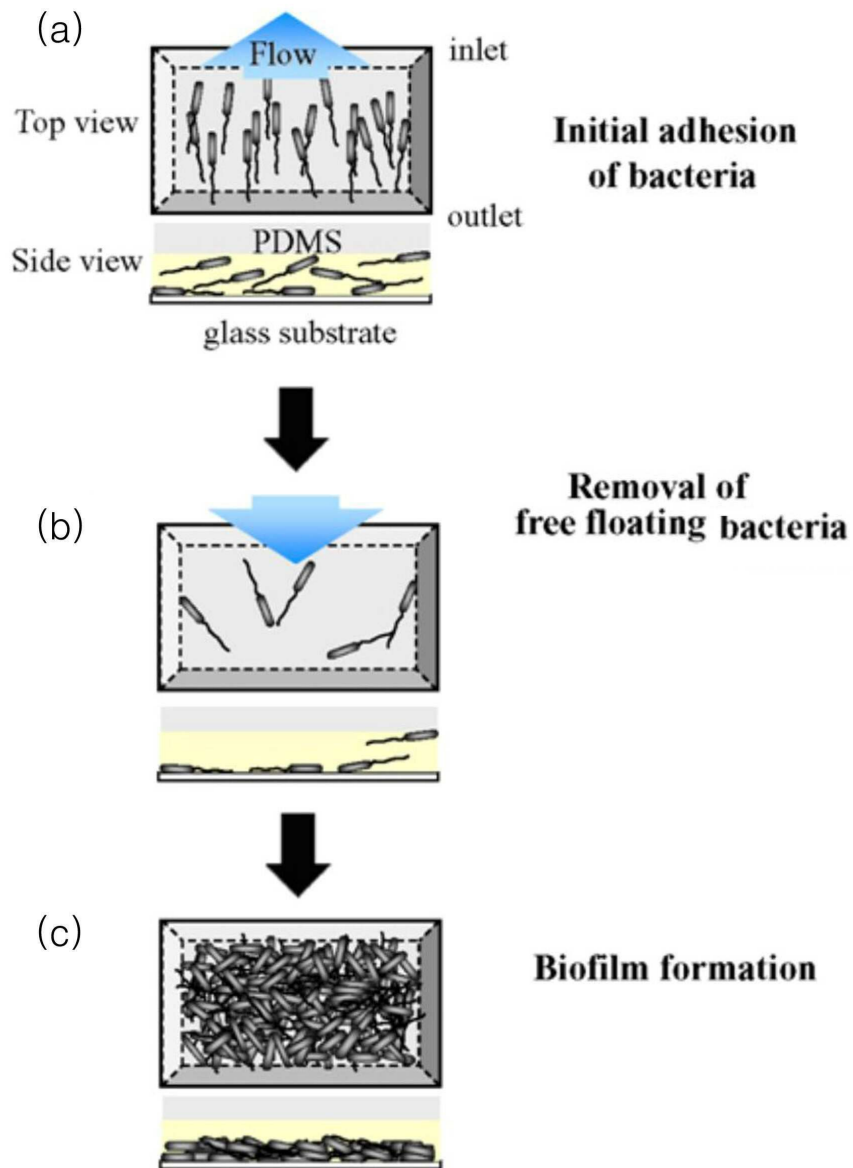
(a)



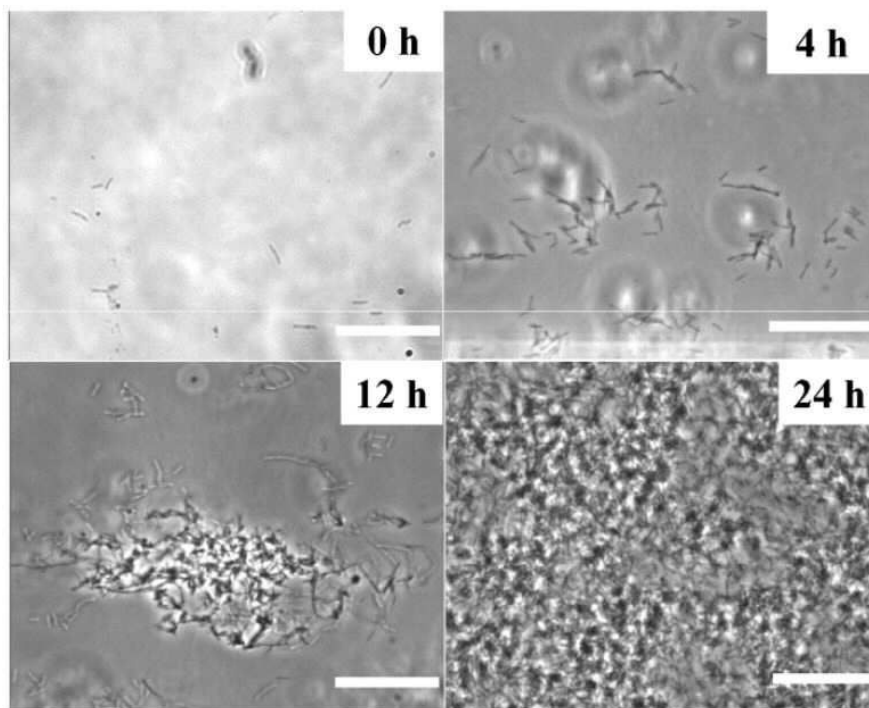
(b)



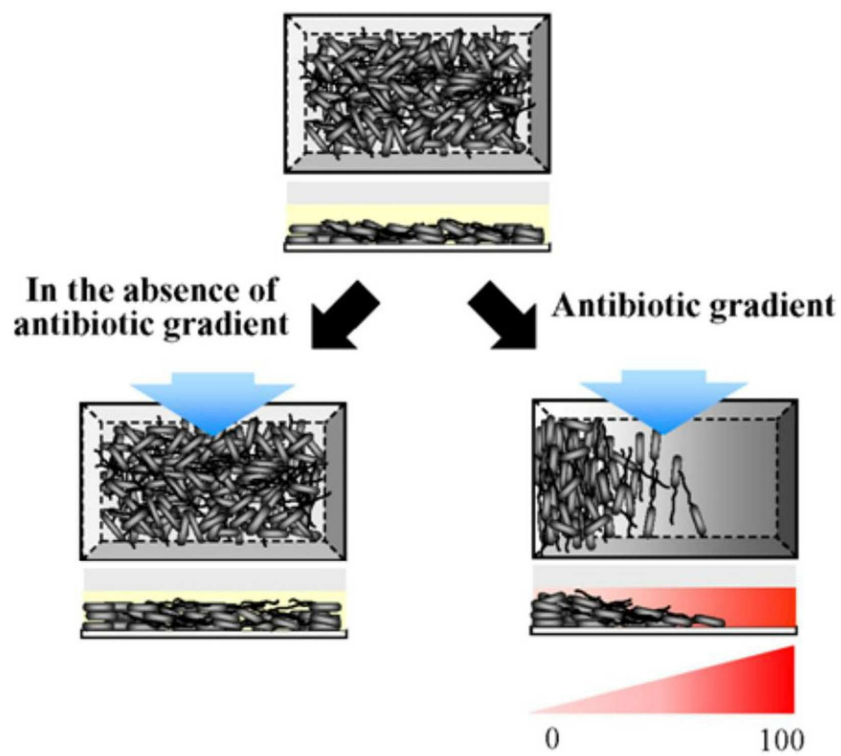
도면4



도면5

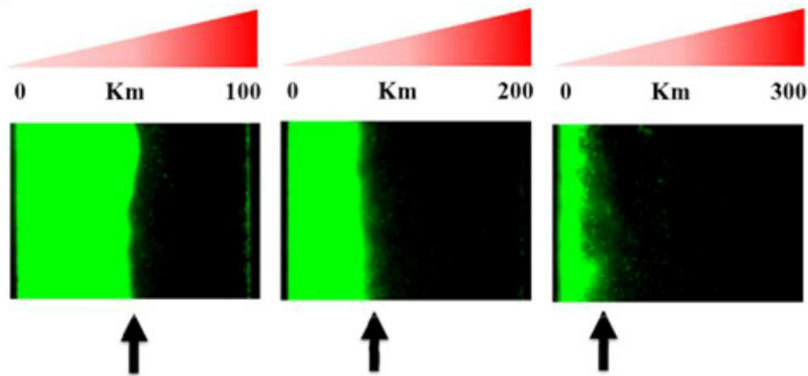


도면6



도면7

(A)



(B)

