



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0089263
(43) 공개일자 2017년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/06 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/06 (2013.01)
B01L 3/5027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0009449
(22) 출원일자 2016년01월26일
심사청구일자 2016년01월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
김영환
서울특별시 성북구 안암로 145, 창의관 615호 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)
최홍일
서울특별시 성북구 개운사길 41-6, 305호 (안암동5가, 그린빌)
(74) 대리인
이처영, 장제환

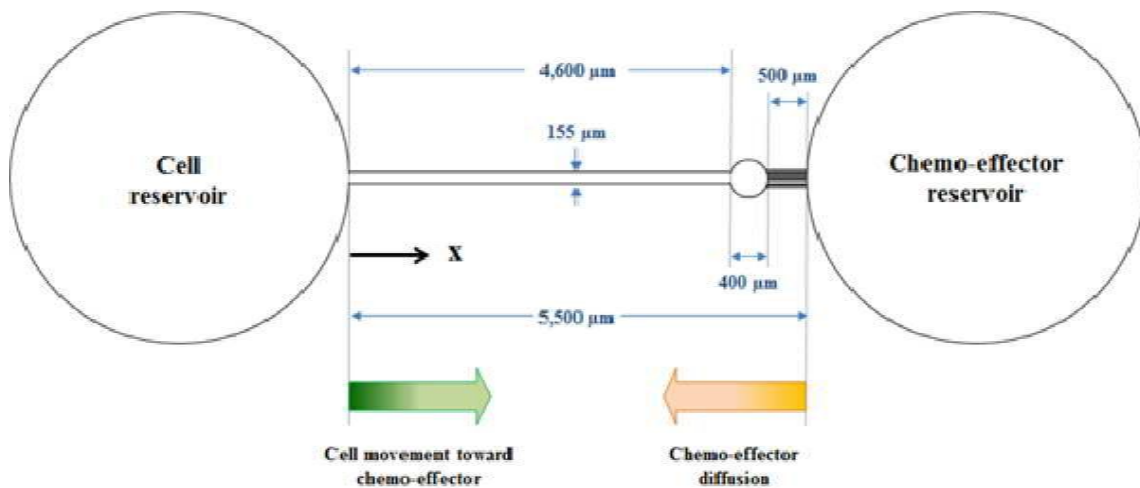
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 미세조류 주화성 분석용 미세유체 장치 및 이를 이용한 미세조류의 주화성 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 미세조류 주화성 분석용 미세유체 장치 및 이를 이용한 미세조류의 주화성 분석방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고체 기판 상에 미세조류 저장부; 주화인자(chemoattractant)의 농도 구배가 형성되고, 미세조류가 이동하는 이동 채널; 이동된 미세조류를 관찰하는 관찰부; 미세조류는 통과하지 못하되, 주화인자가 확산되 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



는 반투과성 물질이 채워진 아가로즈 채널; 및 주화인자 저장부를 포함하고, 상기 이동채널 및 아가로즈 채널의 높이가 15-30 μm 인 미세조류의 주화성을 분석할 수 있는 미세유체 장치 및 이를 이용한 미세조류의 주화성 분석 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 미세유체 장치는 복잡한 이중 레이어(Two-layer) 리소그래피(lithography) 방법을 사용하지 않고, 간단한 단일 레이어 리소그래피 방식으로 제조하여 그 제조가 간단할 뿐만 아니라, 별도의 분리된 관찰부가 존재하여 미세조류를 단일 세포 단계에서 정량적으로 분석할 수 있어, 미세조류의 주화성을 분석하는 데 유용하다.

(52) CPC특허분류

B01L 3/502707 (2013.01)

B01L 2300/0627 (2013.01)

B01L 2400/0487 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015032220

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 Korea CCS 2020

연구과제명 [2-2차년도] 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술

기 여 율 3/5

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G031808521

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 [RCMS]미세조류를 이용한 이산화탄소의 고부가가치 상품 전환 공정의 실증

기 여 율 1/5

주관기관 한국지역난방공사

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015027673

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_도약연구

연구과제명 생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발

기 여 율 1/5

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

고체 기관 상에 (a) 미세조류 저장부; (b) 주화인자(chemoattractant)의 농도 구배가 형성되어 있고, 미세조류가 이동할 수 있는 이동 채널; (c) 이동된 미세조류를 관찰하는 관찰부; (d) 미세조류는 통과하지 못하되, 주화인자가 확산되는 반투과성 물질이 채워진 아가로즈 채널; 및 (e) 주화인자 저장부를 포함하고, 상기 이동채널 및 아가로즈 채널의 높이가 15-30 μm 인 미세조류의 주화성을 분석할 수 있는 미세유체 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기관은 유리, 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리카보네이트(PC) 및 폴리에틸렌설폰(PES)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 이동 채널은 상기 아가로즈 채널보다 긴 것을 특징으로 하는 미세유체 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아가로즈 채널은 5개인 것을 특징으로 하는 미세유체 장치.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 반투과성 물질은 아가로즈(agarose)인 것을 특징으로 하는 미세유체 장치.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 주화인자는 암모늄이온(NH_4^+), 코발트 이온(Co^{2+}) 및 중탄산이온(HCO_3^-)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 제1항의 미세유체 장치의 제조방법:

- (a) 고체 기관 상에 미세조류 저장부; 이동 채널; 관찰부; 아가로즈 채널; 및 주화인자 저장부를 포함하는 몰드를 포토리소그래피하는 단계;
- (b) 상기 몰드에 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS)를 주입하여 캐스트를 제조하는 단계;
- (c) 산소플라즈마를 처리하여 고체기관 상에 상기 캐스트를 결합시키는 단계; 및
- (d) 주화인자 저장부에 주화성 용액과 반투과성 물질의 혼합액을 주입하여 반투과성 막을 형성하는 단계; 및
- (e) 미세조류 저장부에 주화성 용액을 주입하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 주화성 용액은 TP 배지(NH_4Cl , MgSO_4 , CaCl_2 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4)인 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 반투과성 물질은 아가로스(agarose)인 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 미세유체 장치를 이용한, 미세조류의 주화성 분석 방법:

- (a) 주화인자 저장부에 주화인자를 주입하는 단계;
- (b) 이동 채널에 주화인자의 농도구배를 형성하는 단계;
- (c) 미세조류 저장부에 미세조류를 주입하여, 주화인자의 농도에 따라 이동시키는 단계; 및
- (d) 관찰부에 존재하는 미세조류의 수를 측정하는 단계.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 주화인자는 암모늄이온(NH_4^+), 코발트 이온(Co^{2+}) 및 중탄산이온(HCO_3^-)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 미세조류의 주화성 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세조류 주화성 분석용 미세유체 장치 및 이를 이용한 미세조류의 주화성 분석방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고체 기판 상에 미세조류 저장부; 주화인자(chemoattractant)의 농도 구배가 형성되고, 미세조류가 이동하는 이동 채널; 이동된 미세조류를 관찰하는 관찰부; 미세조류는 통과하지 못하되, 주화인자가 확산되는 반투과성 물질이 채워진 아가로스 채널; 및 주화인자 저장부를 포함하고, 상기 이동채널 및 아가로스 채널의 높이가 15-30 μm 인 미세조류의 주화성을 분석할 수 있는 미세유체 장치 및 이를 이용한 미세조류의 주화성 분석방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 근래 화석연료 사용량의 급증으로 인한 에너지자원 고갈문제 및 온실가스 배출에 따른 지구온난화 문제가 전 세계적 관심을 끌고 있다. 이 같은 문제를 해결하기 위한 하나의 대안으로 주목받고 있는 것이 미세조류이다. 미세조류는 일반적으로 chlorophyll, carotenoid, phycobillins 등의 색소를 함유하고 있으며 광합성을 통해 세포성장 및 이에 필요한 유기물질을 합성하는 단세포 생물을 통칭하는 것으로, 일부는 편모가 있어 운동성을 나타내기도 한다. 미세조류는 식물에 비해 성장속도가 빠르고 광 에너지와 이산화탄소 및 무기물질로부터 바이오디젤로 전환이 가능한 중성지질을 다량 생산할 수 있는 능력이 있어 상기 문제들의 현실적 대안으로 손꼽히고 있다. 미세조류는 현재까지 수십만 종 이상이 담수 및 해양생태계에 존재하는 것으로 보고되고 있으며 다양한 목적을 위해 연구개발이 시도되고 있다.

[0004] 하지만 현재 몇 가지 한계점으로 인해 상용화의 길이 열리지 못하고 있는데 특히 미세조류는 대장균(*E. coli*)과 같은 여타 단세포 생물에 비해 세포 생리학에 대한 이해가 불충분하기 때문에 여러 유전적 조작이나 대량 배양 등에 걸림돌이 많아 여전히 그 산업이 개발 단계에 머무르고 있다. 이를 타개하기 위해 클라미도모나스 레인하

티(*Chlamydomonas reinhardtii*)라는 종을 미세조류의 모델 균주로 삼아 비교적 넓은 분야에 대한 연구가 진행 중이다. *C. reinhardtii*는 현재까지 미세조류 중 가장 많은 연구가 진행된 종으로 다른 균주에 비해 형질전환 등 유전자 조작이 용이하고 관련 도구들이 개발되어 있을 뿐만 아니라 유전체 서열도 밝혀져 있어 미세조류의 광합성 기작 등의 연구에 활발히 이용되고 있고 바이오디젤 생산을 위한 지질관련 연구, 수소생산 연구 등에도 활용되고 있다.

[0005] 한편 미세조류가 서식하는 수중 환경은 대기 환경에 비하여 광합성에 열악한 것으로 알려져 있다. 가장 큰 원인은 대기보다 낮은 수중 CO_2 농도인데 이는 수중에서 CO_2 의 낮은 확산도에 기인하기도 하지만 수중에서 용해된 CO_2 가 여러 가지 형태, 예컨대 중탄산 이온(HCO_3^-) 및 탄산 이온 등 무기 탄소 이온 형태로 존재하기 때문이기도 하다. 특히 미세조류의 일반적인 서식 환경인 pH 7.0-9.0에서는 수중 무기 탄산종 중 대부분을 CO_2 가 아닌 중탄산 이온이 차지하고 있기 때문에 미세조류의 효율적 탄소 고정을 위해서는 중탄산 이온의 활용이 매우 중요하다. 이러한 이산화탄소가 부족한 환경 하에서 적응 및 생존하기 위해 미세조류는 일반 육상 식물과 달리 특별한 전략을 활용하여 세포 내 이산화탄소 농도를 높게 유지하게 된다. 미세조류의 광독립 영양 방식(photoautotrophic)의 탄소 고정 시 이산화탄소만을 이용하여 이산화탄소 고정 효소인 RuBisCO에 의해 CO_2 가 무기 탄소 화합물로 고정되게 되는데 이 과정에서 세포막에 존재하는 중탄산 이온 운반체(bicarbonate transporter)와 다량의 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)가 관여하게 되며 이 일련의 과정을 이산화탄소 집중 기작(carbon dioxide concentrating mechanism, CCM)이라고 한다.

[0006] 한편 *E. coli*와 같은 운동성 미생물을 경우 주위 자극에 반응하여 일정한 방향으로 이동하는 반응인 주성이 존재하는데 운동성 미세조류인 *C. reinhardtii*도 마찬가지이다. 특히 주위 환경의 화학종의 종류 및 농도를 감지하여 움직임을 보이는 것을 주화성이라고 하는데 영양분이 최적의 조건으로 존재하는 곳을 찾아가거나 독성 물질을 피해 도망가는 형태의 움직임을 보이는 것이 일반적이다. *C. reinhardtii*의 경우 현재까지 주화성과 관련된 연구가 다양하게 진행되어 왔으나 지금까지의 연구는 주로 아미노산이나 암모늄 이온 등 여러 가지 물질에 대한 반응을 관찰하는 것에 집중되어 있었고 개별 세포단위의 분석을 통한 반응 및 광합성 관련 연구는 미미하였다. 따라서 미세조류에 있어 가장 중요한 무기 탄소 공급원인 중탄산 이온에 대한 주화성의 존재를 확인하고 이에 대해 정량적인 분석을 하는 것은 미세조류의 무기 탄소 활용의 깊은 이해를 위해 선행되어야 할 연구 분야라고 할 수 있다.

[0007] 한편, 최근 들어 미세유체 시스템을 활용한 미세조류 배양 및 분석 시스템의 개발이 시도되고 있는데, 이 시스템을 이용할 경우 분석 시스템의 소형화가 가능하기 때문에 샘플 및 고가의 생화학 시약을 줄일 수 있고, 분석 실험을 병렬적으로 동시에 진행할 수 있어 분석 시간과 경비를 줄일 수 있다. 뿐만 아니라, 재현성 있는 분석 자료를 얻을 수 있다. 또한 세포 기반의 분석 자료는 주로 약물 선별, 약리 동력학, 독성 분석 등에 널리 활용되어 왔으나, 현재는 세포 및 조직 사이에 대사물질 교환이나 세포 내 기작 규명에 활용되고 있다.

[0008] 미세유체 시스템의 제작에 쓰이는 고분자물질인 PDMS (Poly(dimethylsiloxane))는 생물체에 대한 독성이 없고 다공성으로 생물활성에 필요한 물질전달이 용이한 장점을 가지고 있다. PDMS를 이용한 미세유체 시스템은 분석하고자 하는 대상과 목적에 적합한 환경을 위한 맞춤형 설계가 가능하다. 특히 높은 투명도 및 미세구조를 기반으로 광학현미경을 통한 개별 세포에 대한 지속적이고 자세한 모니터링 및 효율적인 고속선별을 가능하게 함으로써 광합성 단세포 생물체의 주화성에 따른 움직임을 정량적으로 이해하는 데 큰 기여를 할 수 있다.

[0009] 기존에 개발된 아가로즈 기반의 미세유체 장치는 복잡한 이중 레이어(Two layer) 리소그래프(lithography) 방법으로 제조되어, 제작에 오랜 시간이 걸리는 단점이 있었다(G. Si, et al., Lab Chip. 12. 1389. 2012.). 또한, 대한민국 특허 제10-1,393,396호에서는 박테리아의 주화성을 검출하기 위한 미세유체 장치를 개발하였으나, 형광물질을 이용해야만 하며, 단일 세포 레벨에서의 검출이 불가능하다는 단점이 있다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점들을 해결하고 중탄산 이온에 대한 미세조류의 주화성을 정량적으로 분석할 수 있는 장치를 개발하고자 예의 노력한 결과, 고체기판상에 미세조류 저장부; 이동 채널; 관찰부; 아가로즈 채널; 및 주화인자 저장부로 구성되는 몰드를 포토리소그래피한 다음, 상기 몰드에 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS)를 주입하여 캐스트를 제조하고 산소플라즈마를 처리하여 고체기판 상에 상기 캐스트를 결합시킨 후, 상기 미세조류 저장부에는 주화성 용액을 주입하고, 주화인자 저장부에는 주화성 용액과 반투과성 물질의 혼합액을 주입하여 미세유체 장치를 제조하였으며, 상기 장치를 이용하여 미세조류의 주화성을

분석할 경우, 정량적인 분석이 가능하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 미세조류의 주화성 분석용 미세유체 장치를 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 미세유체 장치의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 또다른 목적은 상기 미세유체 장치를 이용하여 미세조류의 주화성을 분석하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고체 기판 상에 미세조류 저장부; 주화인자(chemoattractant)의 농도 구배가 형성되고, 미세조류가 이동하는 이동 채널; 이동된 미세조류를 관찰하는 관찰부; 미세조류는 통과하지 못하되, 주화인자가 확산되는 반투과성 물질이 채워진 아가로즈 채널; 및 주화인자 저장부를 포함하고, 상기 이동채널 및 아가로즈 채널의 높이가 15-30 μm 인 미세조류의 주화성을 분석할 수 있는 미세유체 장치를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, (a) 고체기판상에 미세조류 저장부; 이동 채널; 관찰부; 아가로즈 채널; 및 주화인자 저장부를 포함하는 몰드를 포토리소그래피하는 단계; (b) 상기 몰드에 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS)를 주입하여 캐스트를 제조하는 단계; (c) 산소플라즈마를 처리하여 고체기판 상에 상기 캐스트를 결합시키는 단계; 및 (d) 주화인자 저장부에 주화성 용액과 반투과성 물질의 혼합액을 주입하여 반투과성 막을 형성하는 단계; 및 (e) 미세조류 저장부에 주화성 용액을 주입하는 단계를 포함하는 상기 미세유체 장치의 제조방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 상기 미세유체 장치를 이용하며, (a) 주화인자 저장부에 주화인자를 주입하는 단계; (b) 이동 채널에 주화인자의 농도구배를 형성하는 단계; (c) 미세조류 저장부에 미세조류를 주입하여, 주화인자의 농도에 따라 이동시키는 단계; 및 (d) 관찰부에 존재하는 미세조류의 수를 측정하는 단계를 포함하는 미세조류의 주화성 분석 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 미세유체 장치는 복잡한 이중 레이어(Two-layer) 리소그래피(lithography) 방법을 사용하지 않고, 간단한 단일 레이어 리소그래피 방식으로 제조하여 그 제조가 간단할 뿐만 아니라, 별도의 분리된 관찰부가 존재하여 미세조류를 단일 세포 단계에서 정량적으로 분석할 수 있어, 미세조류의 주화성을 분석하는 데 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명에 사용된 미세유체 장치의 구조와 각 채널의 치수, 확산 및 세포 이동의 방향을 보여주는 장치도이다.
- 도 2는 본 발명에 사용된 미세유체 장치의 사진이다.
- 도 3은 본 장치의 핵심부인 관찰부와 아가로즈 채널 부근의 구조와 치수를 표시한 확대 장치도이다.
- 도 4는 아가로즈 채널 형성 과정에 대한 사진이다.
- 도 5는 아가로즈 채널이 형성된 후 세포 이동 채널과 관찰부의 친수성 및 액면 차이에 의해 가해지는 압력에 의해 배지가 채워지는 과정에 대한 사진이다.
- 도 6은 본 발명에 사용된 미세유체 장치 내에서 시간이 흐름에 따라 형성된 세포 이동 채널과 관찰부의 농도 구배를 0.1 mM의 형광 물질을 통해 관찰한 사진 및 그 형광 발현 강도를 수치화하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 미세조류의 공지된 주화인자들에 대한 주화성을 검증한 것으로, (a)-(c)는 염화암모늄(NH_4Cl)에 대한 반응, (d)-(f)는 염화코발트(CoCl_2)에 대한 반응 그리고 (g)-(i)는 염화나트륨(NaCl)에 대한 반응이다. (a), (d) 및 (g)는 각 물질에 대한 반응을 시간이 지남에 따라 관찰한 결과이고 (b), (e) 및 (h)는 관찰 지역에 모여든 세포들의 움직임이 정상상태에 도달했을 때(반응 관찰 후 8시간 후) 각 물질의 농도에 따른 반응을 나타낸 주화성 지표이며, (c), (f) 그리고 (i)의 경우 관찰부에 모여든 세포들의 움직임이 정상상태에 도달했을 때(반응 관찰 후 8시간 후) 관찰부를 찍은 사진이다.

도 8은 본 발명에 사용된 대기 환경에서 배양된 야생형 균주의 중탄산이온에 대한 주화성에 의해 관찰부에 모여든 미세조류의 사진 및 그 반응 정도를 측정한 그래프다.

도 9는 중탄산 이온의 농도 구배에 따라 세포 이동 채널 내에 형성된 세포 띠에 대한 사진과 그 중심 위치를 측정한 그래프이다.

도 10은 세포의 체내 시계에 따른 야생형 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성을 나타낸 그래프이다.

도 11은 부피비 5% 이산화탄소의 환경에서 적응한 야생형 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성을 나타낸 그래프이다. 파선의 경우 도 8에서 제시한 대기 환경에서 배양된 야생형 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성이다.

도 12는 이산화탄소 농축 기작이 결실된 돌연변이 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성을 나타낸 그래프이다. 파선의 경우 도 8에서 제시한 대기 환경에서 배양된 야생형 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성이다.

도 13은 미세조류 세포막에 존재하는 중탄산 이온 수송체의 억제제(DIDS)를 처리한 야생형 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성을 나타낸 그래프이다. 파선의 경우 도 8에서 제시한 대기 환경에서 배양된 야생형 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성이다.

도 14는 미세조류의 외부 탄산 탈수 효소 억제제인 AZ를 처리한 야생형 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성을 나타낸 그래프이다. 파선의 경우 도 8에서 제시한 대기 환경에서 배양된 야생형 균주의 중탄산 이온에 대한 반응성이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0025] 본 발명에서는 유체 흐름 없이(flow-free) 장시간 안정적으로 농도구배를 형성할 수 있는 미세유체 장치를 개발하여 그 성능을 확인하고자 하였다.
- [0026] 본 발명에서는, 단일 레이어(single layer) 리소그래피(lithography)로 미세유체 장치를 설계하고 제조를 수행하였다. 그 결과 본 발명의 미세유체 장치가 장시간 안정적으로 유체 흐름 없이 농도구배를 형성할 수 있어, 주화성 분석에 이용할 수 있음을 확인하였다.
- [0027] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 미세조류 저장부(cell reservoir); 이동 채널; 관찰부; 아가로즈 채널; 및 주화인자(chemoattractant) 저장부(reservoir)를 포함하는 미세유체 장치를 제조하여(도 1 내지 도 5), 장시간 안정적으로 유체의 흐름 없이 농도구배가 형성되는 것을 확인할 수 있었다(도 6).
- [0028] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 고체 기판 상에 미세조류 저장부; 주화인자(chemoattractant)의 농도 구배가 형성되고, 미세조류가 이동하는 이동 채널; 이동된 미세조류를 관찰하는 관찰부; 미세조류는 통과하지 못하되, 주화인자가 확산되는 반투과성 물질이 채워진 아가로즈 채널; 및 주화인자 저장부를 포함하고, 상기 이동채널 및 아가로즈 채널의 높이가 15-30 μm 인 미세조류의 주화성을 분석할 수 있는 미세유체 장치에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 이동 채널 및 아가로즈 채널의 높이는 세포의 겹침을 방지하고 단일 세포 단위의 미세조류 분석을 위하여 15-30 μm , 바람직하게는 20 μm 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 기판은 유리, 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리카보네이트(PC) 및 폴리에틸렌설폰(PES)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 이동 채널은 주화인자 저장부에 주입된 주화인자가 장시간 안정적으로 농도 구배를 형

성할 수 있도록, 아가로즈 채널보다 길게 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 폭이 130-170 μm 이고, 길이가 4,000-6000 μm 인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 아가로즈 채널은 반투과성 물질로 채워져 있어, 주화인자는 통과할 수 있고, 미세조류는 통과할 수 없는 것을 특징으로 하고, 바람직하게는 하나 이상, 더욱 바람직하게는 5개의 채널로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명은 또한, (a) 고체기판상에 미세조류 저장부; 이동 채널; 관찰부; 아가로즈 채널; 및 주화인자 저장부를 포함하는 몰드를 포토리소그래피하는 단계; (b) 상기 몰드에 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS)를 주입하여 캐스트를 제조하는 단계; (c) 산소플라스마를 처리하여 고체기판 상에 상기 캐스트를 결합시키는 단계; 및 (d) 주화인자 저장부에 주화성 용액과 반투과성 물질의 혼합액을 주입하여 반투과성 막을 형성하는 단계; 및 (e) 미세조류 저장부에 주화성 용액을 주입하는 단계를 포함하는 미세유체 장치의 제조방법에 관한 것이다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 주화성 용액은 미세조류의 주화성을 분석할 수 있도록 미세조류가 배양될 수 있는 배지이면 제한없이 사용가능하나, 바람직하게는 TP배지(NH_4Cl , MgSO_4 , CaCl_2 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 표 1)인 것을 특징으로 할 수 있다.

표 1

TP 배지 구성

[0036]

TP Medium	
성분	함량 (in 1L water)
TAP salts (in 1L water)	25 ml
NH_4Cl 15.0 g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.0 g	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g	
Phosphate solution (in 100 ml water)	0.375 ml
K_2HPO_4 28.8 g	
KH_2PO_4 14.4 g	
Hutner' s trace elements	1.0 ml
EDTA disodium salt 50 g (250 ml water)	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g (100 ml water)	
H_3BO_3 11.4 g (200 ml water)	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.06 g (50 ml water))	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61 g (50 ml water)	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57 g (50 ml water)	
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.10 g (50 ml water)	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.99 g (50 ml water)	
Tris base	2.42 g
HCl	1.3 ml

[0038] 본 발명에서, 주화성 용액과 반투과성 물질의 혼합액을 주화인자 저장부에 주입하였을 때, 아가로즈 채널까지만 혼합액이 주입되고, 멈추는 것은 아가로즈 채널과 관찰부의 큰 단면적 차이 때문이다.

[0039] 이는 하기의 식 1과 같은 연속 방정식에 의해 증명된다.

[0040] 식 1: $\rho A_1 V_1 = \rho A_2 V_2$

[0041] 여기서, ρ 는 용액의 밀도이고, A는 채널의 단면적이며, V는 유체의 속도이다. 즉, 아가로즈 채널에 비해 관찰부의 단면적이 매우 넓으므로, 상기 혼합액은 아가로즈 채널만 채우게 되고, 관찰부의 입구에서 멈추게 되는 것이다.

- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 반투과성 물질은 주화인자는 통과할 수 있고, 미세조류는 통과할 수 없는 물질이고, 온도차에 의해 경화되는 물질이면 제한 없이 사용가능하나, 바람직하게는 아가로즈(agarose)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 주화인자는 암모늄이온(NH_4^+), 코발트 이온(Co^{2+}) 및 중탄산이온(HCO_3^-)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 한편, 본 발명의 미세유체 장치를 이용할 경우, 미세조류의 주화성을 정량적으로 분석할 수 있을 것으로 예측하였다.
- [0046] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 미세유체 장치를 제조한 후, 이를 이용하여 다양한 조건에서 미세조류의 주화성을 분석하였다. 즉, 이미 공지된 주화인자를 상기 미세유체 장치에 주입하여 주화성을 분석할 수 있는지를 검증하였고(도 7), 알려지지 않은 주화인자(중탄산이온)에 대한 미세조류의 주화성을 정량적으로 분석하였으며(도 8 및 도 9), 미세조류의 생체시계에 따른 중탄산이온에 대한 주화성을 분석하였고(도 10), 이에 관여하는 대사경로를 검증하였다(도 11 내지 도 14). 그 결과, 본 발명의 미세유체 장치를 이용할 경우, 미세조류의 주화성을 정량적으로 분석할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0047] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명의 미세유체 장치를 이용하며, (a) 주화인자 저장부에 주화인자를 주입하는 단계; (b) 이동 채널에 주화인자의 농도구배를 형성하는 단계; (c) 미세조류 저장부에 미세조류를 주입하여, 주화인자의 농도에 따라 이동시키는 단계; 및 (d) 관찰부에 존재하는 미세조류의 수를 측정하는 단계를 포함하는 미세조류의 주화성 분석 방법에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 주화인자는 암모늄이온(NH_4^+), 코발트 이온(Co^{2+}) 및 중탄산이온(HCO_3^-)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서 주화성의 정량적인 분석은 주화성 인덱스(chemotaxis index, CI)를 계산하여 수행하였다. CI 값은 하기의 식 2로 계산할 수 있다.
- [0050] 식 2:
$$CI = \frac{N_{\text{chemo-effector}}}{N_{\text{control}}}$$
- [0051] 여기서, $N_{\text{chemo-effector}}$ 는 주화인자에 의해 관찰부로 유도된 미세조류의 개수이고, N_{control} 은 주화인자가 없을 때, 자연적으로(spontaneously) 이동한 미세조류의 개수이다.
- [0052] 본 발명에서는 주화인자 저장부에 주화인자를 주입하여 아가로즈 채널을 거쳐 관찰부 및 이동 채널로 주화인자의 농도 구배가 형성된다. 따라서, 10mM의 주화인자를 주입하였다 하더라도, 확산에 의해 농도구배가 형성되는 관찰부의 주화인자 농도는 10mM이 아니게 된다.
- [0053] 유체의 흐름이 없을 때, 화합물의 확산은 피의 제2법칙으로 계산할 수 있다.
- [0054] 식 3:
$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c$$
- [0055] 여기서, c 는 농도이고, t 는 확산시간이며, D 는 화합물의 확산 상수이다. 만약 확산이 x 축을 따라서만 발생한다면, 상기 식은 아래와 같이 풀리게 된다.
- [0056] 식 4:
$$c(x,t) = C_0 \left[1 - \text{erf} \left(\frac{L_0 - x}{2\sqrt{Dt}} \right) \right]$$
- [0057] 여기서, C_0 는 주화인자 주입부에 주입된 주화인자의 농도이고, L 은 전체 채널의 길이이다(이동 채널+관찰부+아가로즈 채널). 이론적으로, 채널 끝 ($x=0$)에서 주화인자의 농도는 0으로 계산되기 때문에, 초기 조건은 $c(x,0)=0$ 이고 바운더리 조건(boundary condition)은 $c(0,t)=0$ 및 $c(L_0,t)=c_0$ 이다. 완전히 확산되어 안정화된 상태에 도달한 채널에서의 주화인자 농도는 하기 식과 같이 선형의 농도구배를 형성하게 된다.

[0058] 식 5:
$$c(x) = C_0 \frac{x}{L_0}$$

[0059] 본 발명의 미세유체 장치에서 fluorescein 용액의 확산을 분석하여 상기 식과 같이 선형의 농도구배가 형성되는 것을 확인하였다(도 6).

[0060] 또한, 주입된 주화인자의 농도와 관찰부에서 주화인자의 농도는 하기의 식과 같과 같이 계산할 수 있다.

[0061] 식 6:
$$C_M = \frac{1}{1 + \frac{A_0 L_0}{N A_a L_a}} C_s$$

[0062] 여기서, C_M 은 이동 채널+관찰부의 길이를 더한 지점에서 주화인자의 농도이고, A_a 및 A_0 는 아가로즈 채널 및 관찰부+이동 채널의 각각의 단면적을 의미하며, L_a 및 L_0 는 아가로즈 채널 및 관찰부+이동 채널의 길이를 의미한다.

[0063] 즉, 본 발명에서 관찰부에서 주화인자의 농도는 $C_M = 0.866 C_s$ 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0068] 실시예 1: 미세유체 장치 설계 및 제조

[0069] 실시예 1-1. 미세유체 장치 설계

[0070] 미세유체 장치는 양 끝에 미세조류 저장부 및 주화인자 저장부를 포함하고, 미세조류 저장부는 길이 4,600 μm , 높이 20 μm 및 폭 155 μm 인 이동 채널과 연결되고, 이동 채널은 다시 지름 400 μm 인 관찰부와 연결되며, 관찰부와 주화인자 저장부는 길이 500 μm 인 아가로즈 채널 5개가 병렬로 연결되도록 설계하였다(도 1 및 도 3).

[0072] 실시예 1-2. 미세유체 장치 제조

[0073] AutoCAD 소프트웨어(Autodesk)를 이용하여 상기 디자인을 생성한 다음, 포토마스크 필름으로서 투명한 필름에 인쇄하였다. SU-8 50 negative photoresist(MicroChem)을 이용하여 실리콘 웨이퍼에 공지된 포토리소그래피 방법으로 PDMS cast의 master를 제조하였다.

[0074] 10:1 w/w PDMS prepolymer 혼합물인 184 Sylgard base and curing agent(Dow Corning)를 상기 master에 주입하여 degassing 작업을 수행한 후, 80°C 오븐에서 curing하였다.

[0075] 산소 플라즈마를 10초간 처리하여 슬라이드 글라스와 상기에서 제조한 PDMS cast를 결합하여 미세유체 장치를 제조하였다(도 2).

[0076] 주화인자 저장부에는 2.5 μl 의 3% w/v 아가로즈와 혼합된 TP 배지를 주입하여, 아가로즈 채널을 형성하였으며(도 4), 세포 저장부에는 TP 배지를 주입하여 관찰부까지 생성된 공기를 제거하였다(도 5).

[0078] 실시예 2: 미세유체 장치를 이용한 안정적인 농도 구배 형성

[0079] 상기 실시예 1에서 제조한 미세유체 장치의 주화인자 주입부에 0.1mM fluorescein과 혼합된 TP 배지를 주입한 다음, 1시간 마다 형광이미지를 5X object lens 및 AxioCam CCD camera를 포함하는 Axio Observer D1 도립현미경(Carl-Zeiss)으로 3초간 노출하여 촬영한 다음, AxioVision image software(Carl-Zeiss)와 ImageJ software(National Institutes of Health)를 이용하여 정량적으로 분석하였다.

[0080] 그 결과, 4기간 이후부터 안정적인 농도구배가 형성되는 것을 확인하였으며(도 6), 관찰부에서 화합물의 농도가 주화인자 저장부에 주입된 화합물 농도의 0.866배인 것을 확인하였다.

[0082] 실시예 3: 알려진 주화인자의 미세조류 주화성 확인

[0083] 실시예 3-1. 미세조류 균주 및 배양 배지

[0084] 야생 균주인 클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*) CC-125(mt⁺ aggl⁺ nit1 nit2) 및 CIA5 유전자에 변이를 가지는 CC-2702(cia5) 균주는 Chlamydomonas Resource Center(The University of Minnesota)에서 구입하였다. 야생 균주는 일반적인 이산화탄소 환경 또는 높은 이산화탄소 환경(5%(v/v))에서 배양하였고, 변이 균주는 낮은 이산화탄소에서는 이산화탄소집중기작(CCM)이 없어 못 자라기 때문에 높은 이산화탄소 환경에서 배양하였다.

[0085] 모든 균주는 100ml의 플라스크에서 광합성 가능한 조건으로 23℃, 120rpm shaking incubator에서 50ml의 TP 배지(NH₄Cl, MgSO₄, CaCl₂, K₂HPO₄, KH₂PO₄)를 이용하여 배양하였다.

[0087] 실시예 3-2. 알려진 주화인자의 미세조류 주화성 확인

[0088] 실험에 앞서 균주의 활동성을 유지하기 위해 4일 마다 최초 OD₈₀₀=0.1로 계대배양하였고, 3000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 모은 다음, TP 배지에 OD₈₀₀=1.0이 되도록 재현탁하였다.

[0089] 각 미세유체 장치의 주화인자 주입부에 10mM, 50mM, 100mM의 알려진 주화인자(NH₄Cl, CoCl₂ 및 컨트롤로서 NaCl)를 주입하고, 4시간 동안 농도구배가 형성되도록 기다린 다음, 상기 cell suspension을 35μl 씩 각 미세유체 장치의 미세조류 저장부에 주입하여 주화성을 측정하였으며, 의도치 않은 미세조류의 주광성에 의한 이동을 방지하기 위하여 모두 암실에서 실험을 진행하였다.

[0090] 그 결과, 기존에 알려진 바와 같이 NH₄Cl 및 CoCl₂에 대하여 미세조류가 주화성을 띄며, 암모늄 이온의 경우에는 10mM에서 가장 강한 주화성을 나타내고, 코발트이온에 대해서는 양성 주화성을 보이나 특정 농도에서 눈에 띄는 강한 주화성을 나타내지는 않으며, NaCl에 대해서는 주화성을 나타내지 않는다는 것을 확인하였다(도 7)

[0092] 실시예 4: 중탄산이온(HCO₃⁻)에 대한 미세조류 주화성 확인

[0093] 실시예 4-1. 중탄산이온에 대한 미세조류 주화성 확인

[0094] 실시예 3에서 수행한 방식으로 야생형 균주를 배양하고, 주화성 인자를 중탄산나트륨(NaHCO₃)로 변경하여 10mM에서 1000mM까지 10mM 단위로 농도를 변경하여 주화성을 분석하였다.

[0095] 그 결과, 30mM 농도의 중탄산이온에 대하여 미세조류의 주화성이 가장 강하게 나타나는 것을 확인하였으며(도 8), 주화인자 주입부에 주입한 중탄산나트륨의 농도가 증가할수록, 이동 채널에 형성되는 미세조류가 가장 많이 분포하는 밴드가 미세조류 저장부로 이동하는 것을 확인하였다(도 9).

[0097] 실시예 4-2. 미세조류 생체시계에 따른 주화성 확인

[0098] 생체리듬을 통일시키기 위하여 야생형 균주를 낮은 이산화탄소 농도에서 12시간 낮과 12시간 밤 사이클로 배양하였다. 생체리듬을 통일시킨 다음, 실시예 3과 같은 방법으로 30mM의 중탄산이온에 대한 주화성을 실험하였다. 다만, 24시간동안 12시간 낮, 12시간 밤 조건에서 실험하였으며, 6시간 간격으로 1시간 마다 암실에서 주화성을 테스트하였다.

[0099] 그 결과, 중탄산이온에 대한 미세조류의 주화성은 한 밤(middle of dark period)에 가장 강하게 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 기존에 알려진 암모늄이온에 대한 결과가 일치한다(도 10).

[0101] 실시예 4-3. 이산화탄소집중기작(CCM)과 미세조류 주화성의 연관성 확인

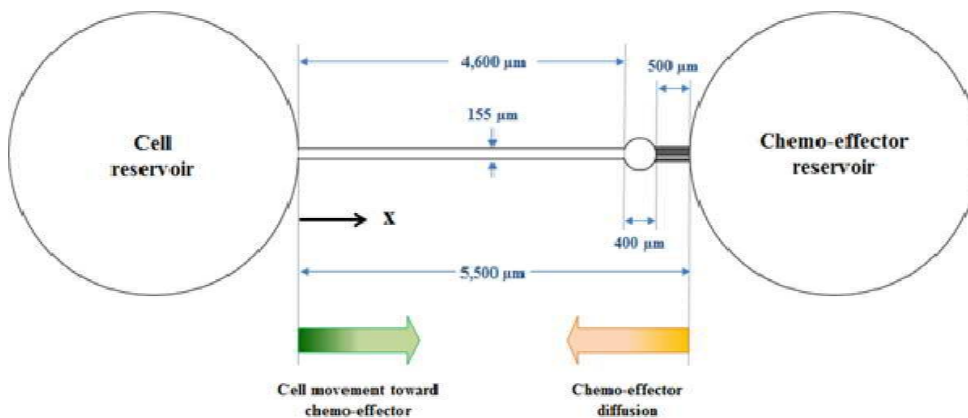
[0102] 야생형 균주는 실시예 3의 방식으로 배양하되, 낮은 농도의 이산화탄소와 높은 농도의 이산화탄소 조건에서 배양하였고, CCM 관련 효소들의 주화성 관련 여부를 파악하기 위하여, 외부 탄산무수화효소 억제제인 50 μ M의 5-acetamido-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide(AZ) 또는 잠재적인 $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ 음이온 교환 억제제인 500 μ M의 4,4'-dithiocyanatostilbene-2,2' disulfonate(DIDS)를 처리하여 배양하였으며, 변이 균주는 높은 농도의 이산화탄소 농도에서 배양하였다.

[0103] 그 결과, 높은 농도의 이산화탄소조건에서 배양한 야생형 균주의 경우, 높은 농도의 중탄산이온에 대하여 주화성을 나타내는 것을 확인하였고(도 11), 변이 균주가 CCM 대사경로가 작동하지 않기 때문에 높은 농도의 중탄산이온에 대한 주화성을 나타내는 것을 확인하였으며(도 12), DIDS를 처리한 야생형 균주의 경우 30mM 이상의 중탄산이온에 대하여 높은 주화성을 나타내는 것을 확인하였고(도 13), 탄산무수화효소의 억제제인 AZ를 처리한 야생형 균주의 경우에는 주화성에 별다른 변화가 일어나지 않는 것을 확인하였다.

[0105] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

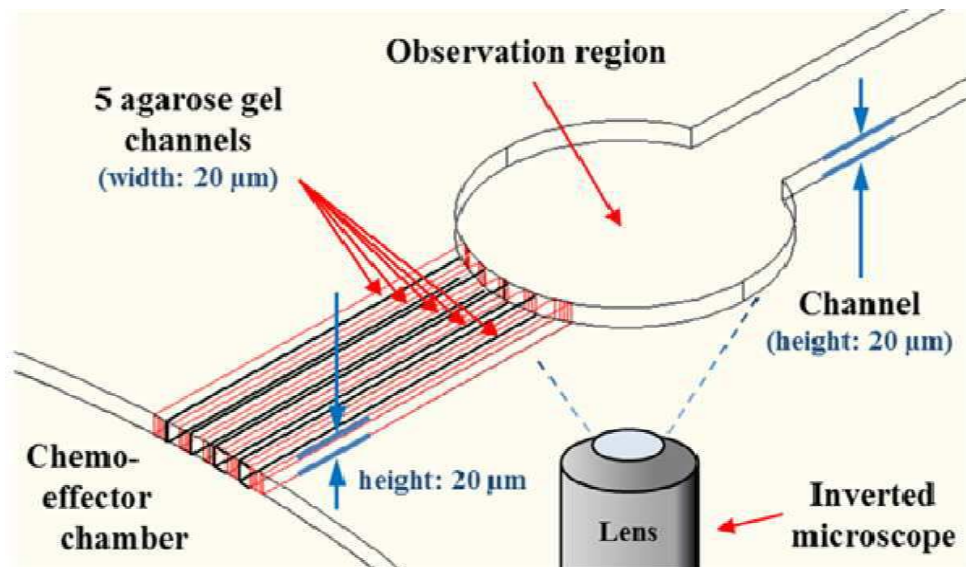
도면1



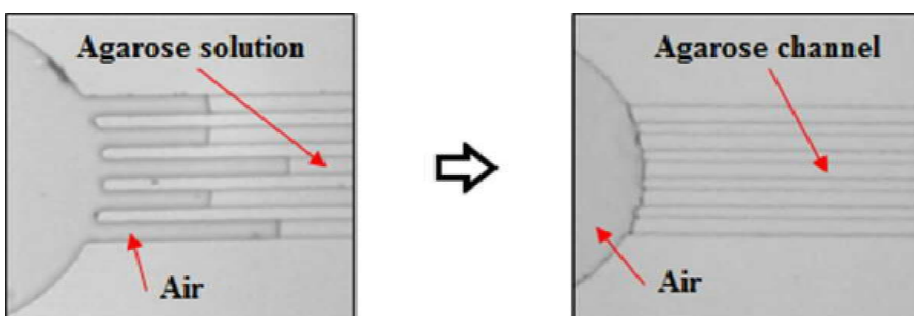
도면2



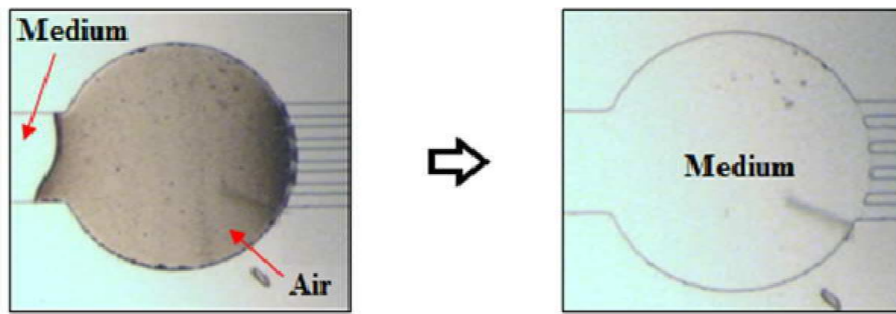
도면3



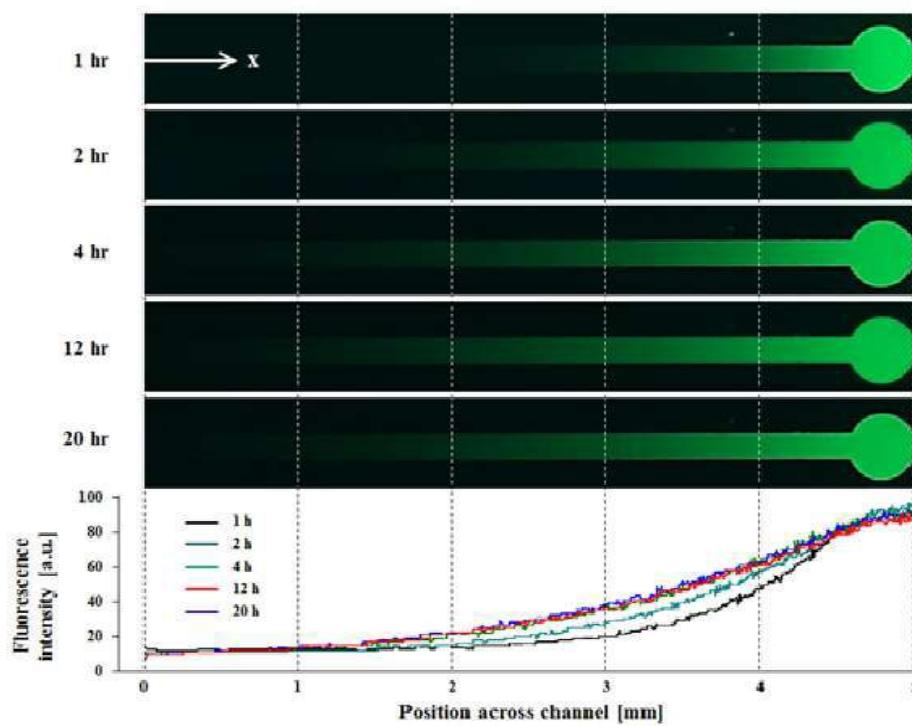
도면4



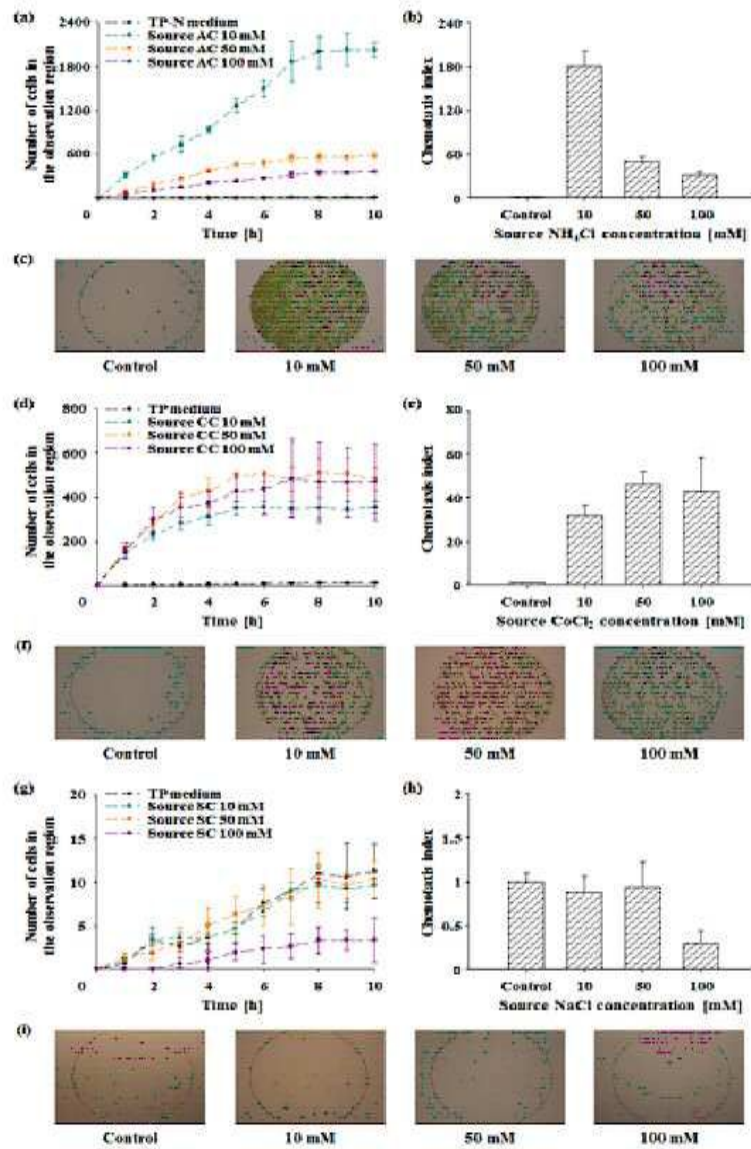
도면5



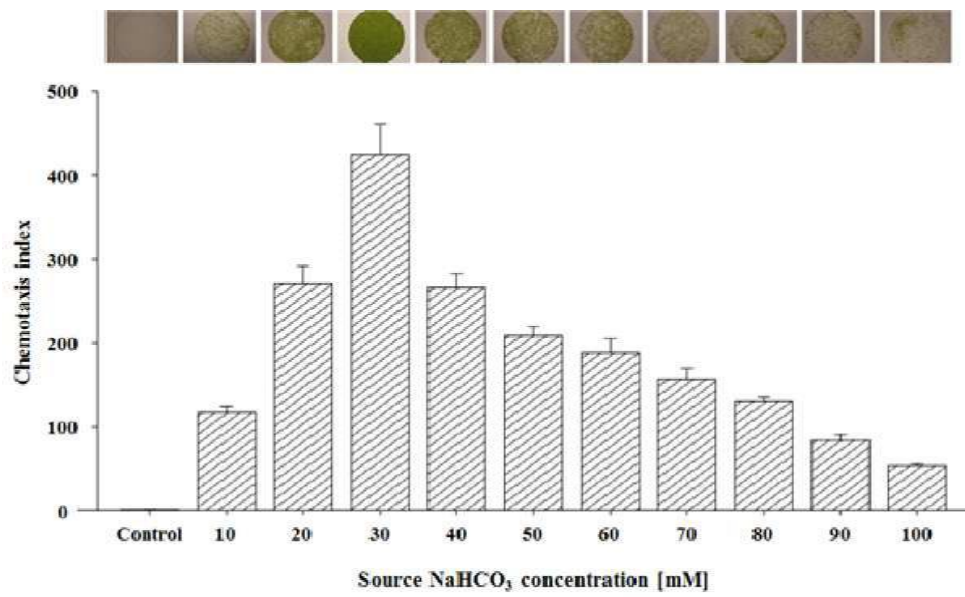
도면6



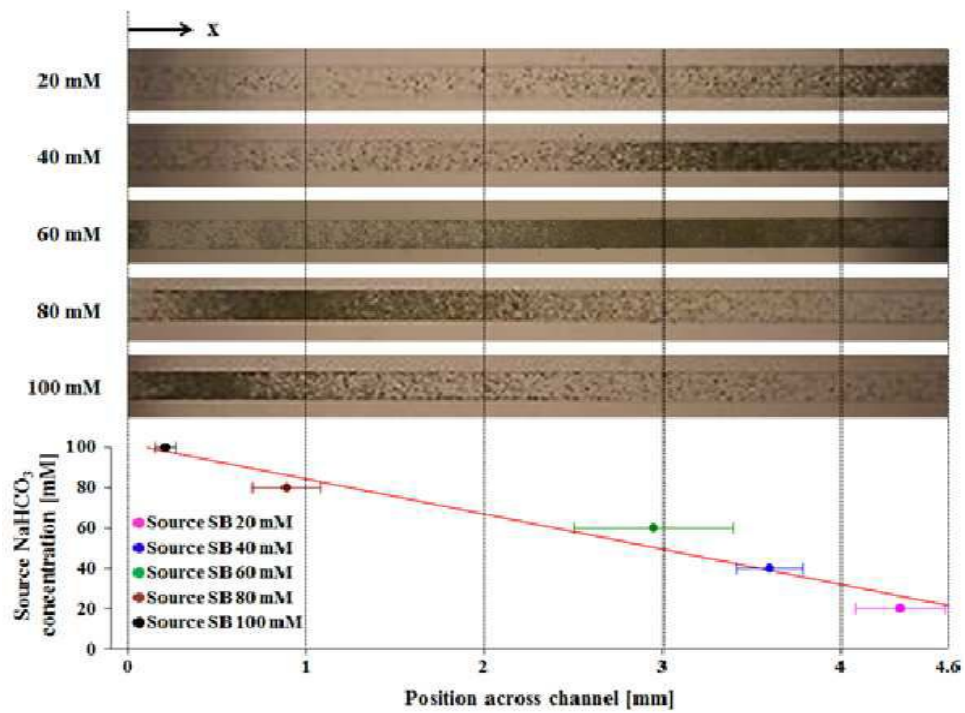
도면7



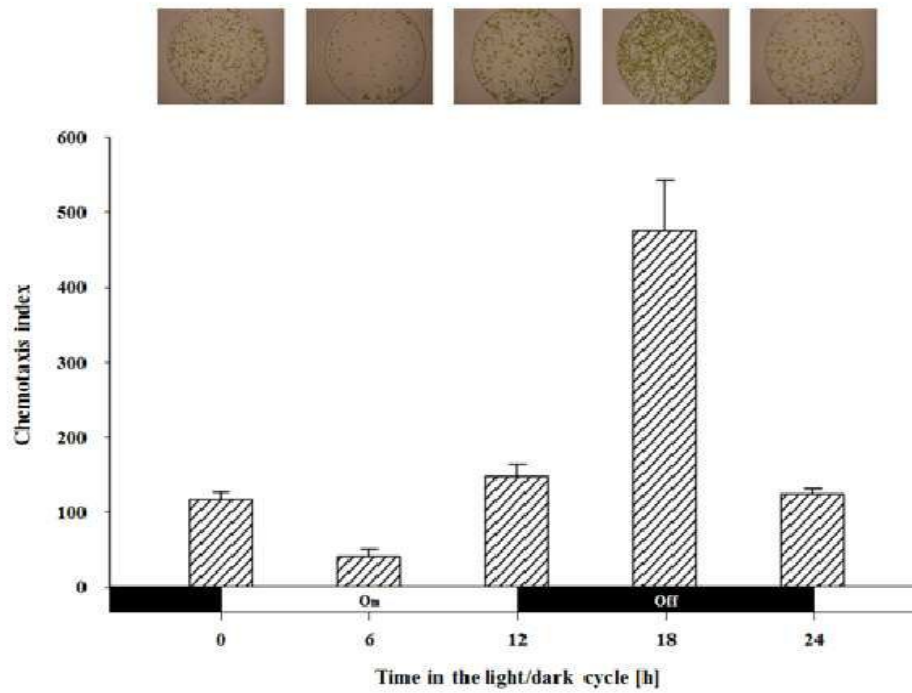
도면8



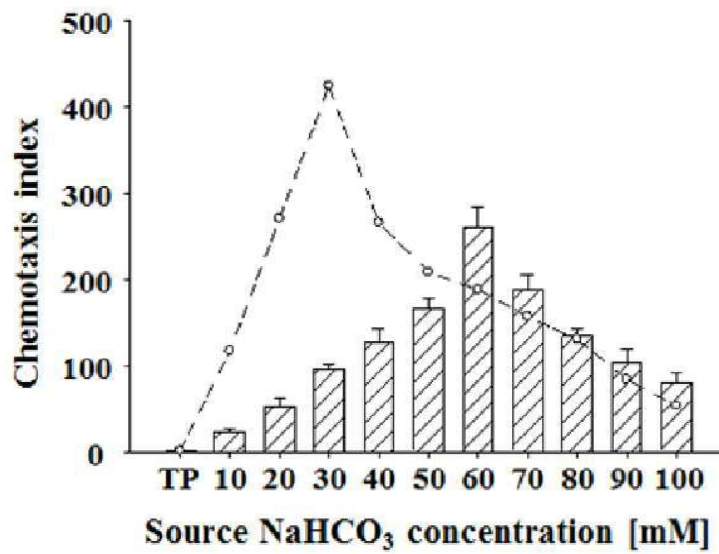
도면9



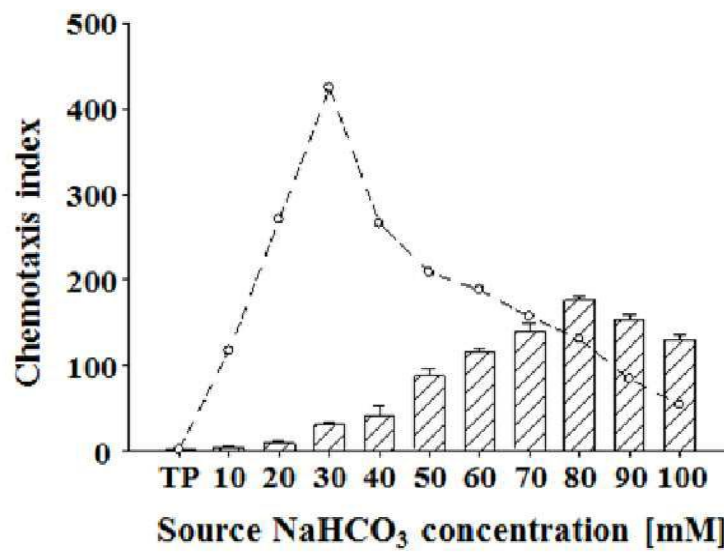
도면10



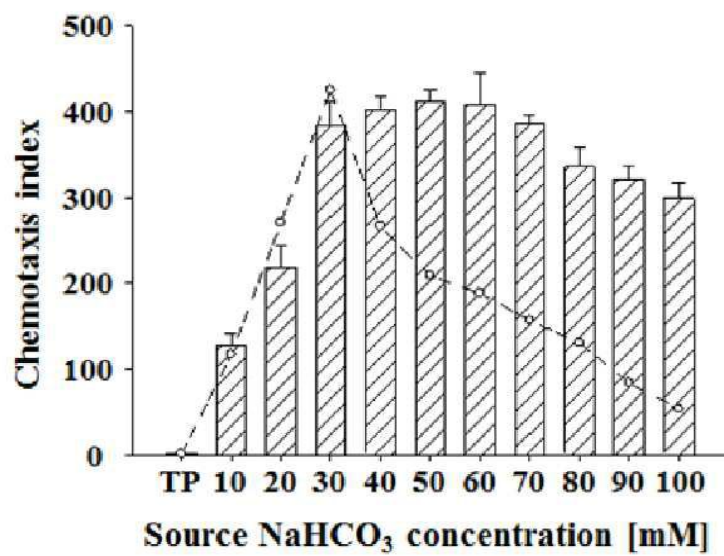
도면11



도면12



도면13



도면14

