

마이크로유체 장치를 이용한 정자 chemotaxis 평가.

김태용*(삼성 SDI), 오택열(경희대 기계공학과)

Assessing The Chemotaxis Of Spermatozoa By Microfluidic Device

T. Y. Kim(Samsung SDI), T.Y. Oh(Mechanical Eng. Dept., KHU)

ABSTRACT

Chemotaxis, or preferential motion due to presence of a chemical gradient, is an important factor in sperm fertilization of eggs in that it is the first interaction between sperm and egg. In the present study, we aim to quantify the possible chemoattractive role of the jelly coat. The chemotaxis of the sperm of sea urchin was demonstrated with the effective motility coefficient by a microchannel made of polydimethylsiloxane (PDMS). The relevance of these findings is that they provide insight on the first steps towards egg fertilization.

Key Words: chemotaxis, spermatozoa, jelly coat, clustering, surface tension, microfluidic device, motility coefficient, eggwater

1. 서론

화학물질의 gradient의 존재에 따라서 편향된 움직임을 chemotaxis라 한다. 이러한 chemotaxis는 정자와 난자의 수정 메카니즘, 박테리아와 영양분의 분포, 감염에 대한 neutrophil 이동등에서 볼 수 있다[1]. 특히, 수정단계에서 chemotaxis는 정자와 난자간의 여러가지의 상호작용중의 첫번째 상호작용으로써 수정의 성패를 초기에 결정짓는 생명체의 종족번식에서 중요한 인자중 하나이다.

체의 수정동물인 성게(sea urchin)의 난자의 외부 둘러싸고 있는 jelly coat는 수정에서의 중요성을 강조하는 여러 가설들이 제안 되어 왔다. 물리적으로 크게 하여 충돌률을 높일 수 있고, 정자들이 동시에 난자를 뚫는 polyspermy 현상을 줄일 수 있다. 또한 정자의 acrosomal reaction에 특정한 화학물질을 유도 하기도 하며, fibrous 구조의 jelly coat는 난자를 외부의 shear로 부터 보호할 수 있다. jelly coat가 시간에 따라 분해가 되어 난자 주변에 chemoattractant의 gradient를 형성하여 정자로 하여금 랜덤운동이 아닌 편향된 운동을 하게 한다. 수정에 있어서 Polyspermy를 유도하지 않는 범위안에서의 chemotaxis는 이상적인 해법이 될수 있다.

Chemotaxis를 보여주기 위한 수학적 모델은 대부분 시간에 대한 연속적 모델이었다[2,3]. 이러한 모델은 초기조건을 설정해주는데 유체역학적인 어려움과 측정 타이밍에 대한 어려움을 가지고 있다.

이런문제들을 해결하기 위해 microfluidic channel을 사용하였다. Channel 안의 stoke flow 특성을 사용하여 시간 domain을 공간 domain으로 변환시킴으

로써 타이밍에 관계없이 측정할수 있게 하는 동시에 초기조건을 형성하는데 어려움을 없앨 수 있었다. 또한, 표면장력을 이용하여 정자에 영향없이 안정하게 유동을 만들었다. 이 장치로 부터 정자의 motility coefficient를 구하고 jelly coat가 녹아있는 해수(seawater)에 노출되었을때의 effective motility coefficient를 구하여 비교하였다.

2. 방법

2.1 수학적 모델

질량보존법칙을 적용하여 연속적 대류-확산모델을 유도해 낼 수 있다. 작은 스케일과 속도 때문에 fully developed laminar flow로 가정하였다. 채널의 상대적으로 작은 높이 때문에 z 성분은 무시될 수 있다. x-z 평면에 대해서는 점성력(viscous forces)이 압도하여 2 차식의 속도 프로파일을 나타낸다. 반면 x-y 평면에 대해서는 벽면의 점성력이 무시가 되고, 우리가 현미경으로 관찰할 수 있는 유일한 focal plane은 x-y 평면이기 때문에 x 방향을 따라서 일정한 유속으로 단순화 할 수 있다. 구해진 식을 Fourier series와 separation of variables를 이용하여 풀면 다음과 같이 채널안에서 sperm concentration 표현할 수 있는 analytical solution을 구할 수 있다.

$$\rho(x, y) = \rho_0 \left(\frac{w-w_1}{w} - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin\left(\frac{n\pi w_1}{w}\right) \cdot \cos\left(\frac{n\pi y}{w}\right) \cdot e^{-\left(\frac{n\pi}{w}\right)^2 \alpha} \right)$$

$\alpha = \frac{D}{u}$, 여기서 D가 motility coefficient이다.

표면장력에 의한 pressure difference는 reservoirs 표면에너지를 좌표성분으로 미분하여 얻을수 있다[4].

$$\Delta P_{capillary} = -2\gamma_{al} \cos \theta \left(\frac{\Delta w}{(\Delta w + w_o)w_o} \right) \text{이다.}$$

또한 이에 따른 Re 와 entrance length 는

$$Re_{hy} = \frac{\rho_w u_{av} D_h}{\mu} = \frac{\rho_w w h^3}{6\mu^2 L(w+h)} \left(\frac{\Delta w}{(\Delta w + w_o)w_o} \right)$$

$$L_e \approx 0.06d \cdot Re = 0.02 \frac{\rho_w w^2 h^4}{\mu^2 L(w+h)^2} \left(\frac{\Delta w}{(\Delta w + w_o)w_o} \right)$$

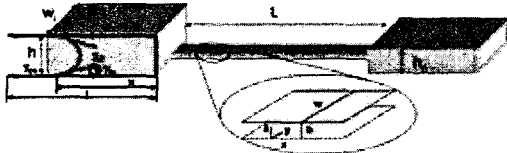


Fig. 1 schematic description of the microfluidic device for mathematic modeling

2.2 재료, 제작 및 측정

성게(*Arbacia punctulata*)에 0.5 ml 의 0.5 M KCl 을 투여함으로써 정자와 난자를 얻어내어 4°C 에 보관 하였다. 정자는 해수에 200 배 희석하였으며, 난자는 200,240,300,400,600 희석시켜서 jelly coat 를 완전히 녹인후에 filtering 하여 준비했다(eggwater).

채널은 lithography 를 이용하여 PDMS 로 제작되었으며, plasma oxidation 으로 hydrophobic 인 PDMS 를 Hydrophilic 하게 만들었다[5].

정자의 concentration profile 을 구하기 위하여 전체의 concentration 이 항상 일정하다고 가정하여 다음과 같이 스케일링 하였다.

$$high = \frac{average - low(1-n)}{n}, \quad n = \frac{W_{inlet}}{W_{total}}$$

실험에서 얻은 profile 과 analytic profile 을 서로 비교하여 D(motility coefficient)을 정의하였다.

3. 결과

Reservoir 의 표면장력에 의한 채널 양끝단의 pressure difference 는 13.3 Pa 이었다. 또한 Re 는 0.369 이고 entrance length 는 4.28μm 이었다. 이로부터 채널안에서는 stoke flow 상태임을 확인할 수 있었다. 평균유속은 1.99mm/sec 이었다. 정자의 average path velocity 가 약 30-60μm/sec 로 유속에 비하여 매우작기때문에 random motion 의 연속모델의 가정이 타당함을 보여 준다.

일반 해수에서 정자의 motility coefficient 는 약 $1.25 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{sec}$ 이었고, jelly coat 가 녹아 있는 해수에서는 motility coefficient 가 약 2.5 배 이상 증가하였다($3.08 \sim 3.31 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{sec}$). 이는 랜덤운동에 대한 Einstein relation 과 Poisson statistics 관점의 속도-확산 관계로부터 정자의 운동성이 약 1.63 배 증가 함을 알 수 있다[6]. 또한 eggwater 에 노출되었을 때 clustering 현상을 inlet 부근에서 관찰할 수 있다.

4. 결론

Microfluidic device 를 이용하여 mixed flow 에 대한 편미분방정식으로 부터정자의 motility coefficient 를 analytic 하게 구할 수 있다. 그리고 effective motility coefficient 를 측정 하여 정자가 chemoattractant 에 노출되었을때 명백히 운동성이 증가하고 편향운동을 보임을 관찰할 수 있다.

Microscale 에서는 표면장력이 유체를 일정하게 흐르게 할 수 있는 수동적인 펌프로 작용할 수 있음을 확인 하였다.

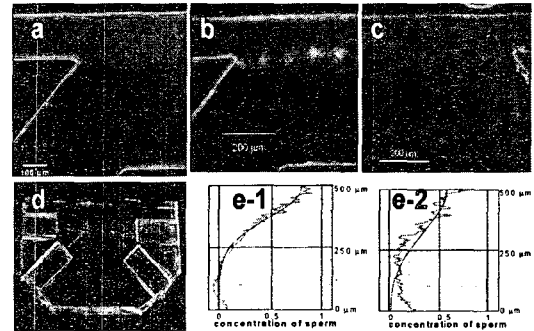


Fig. 2 a) Sperm distribution at the inlet in seawater, b) Sperm clustering exposed to eggwater, c) Distribution at the outlet in eggwater, d) Microfluidic device, e)analytic concentration profile and measured profile in pure seawater and eggwater respectively.

참고문헌

1. Kirkman-Brown, J. C., Sutton, K. A. and Florman, H. M., "How to attract a sperm," *Nature Cell Biology*, Vol. 5, pp. 93-96, 2003.
2. Chalub, F., Markowich, P. A., Perthame, B. and Schmeiser, C., "Kinetic models for chemotaxis and their drift-diffusion limits," *Monatshefte Fur Mathematik*, Vol. 142, pp.123-141, 2004.
3. Lewus, P. and Ford, R. M., "Quantification of random motility and chemotaxis bacterial transport coefficients using individual-cell and population-scale assays," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.75, pp. 292-304, 2001.
4. Holden, M. A., Kumar, S., Beskok, A. and Cremer, P. S., "Microfluidic diffusion diluter: bulging of PDMS microchannels under pressure-driven flow," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol.13, pp. 412-418, 2003.
5. Suh, R. S., Phadke, N., Ohl, D. A., Takayama, S. and Smith, G. D., "Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics," *Human Reproduction Update*, Vol. 9, pp. 451-461, 2003.
6. Berg, H. C., "Random walks in biology," Princeton, N.J.: Princeton University Press., 1993.