

박테리아 주화성 검사용 마이크로 플루이드 칩

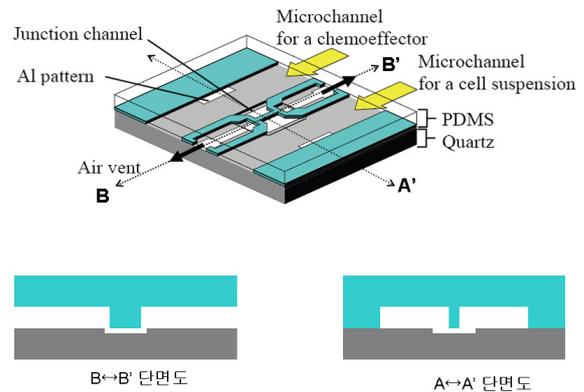
이상호*, 정현호**, 김기영*, 이창수**
한국생산기술연구원*, 충남대학교

Microfluidic chip for the analysis of bacterial chemotaxis

Sang-Ho Lee*, Heonho Jeong**, Ki Young Kim*, Chang-Soo Lee**
Korea Institute of Industrial Technology*, Chungnam National University**

Abstract - Chemotaxis is the directed movement of cells in gradients of signaling molecules, an essential biological process that underlies morphogenesis during development, and the recruitment of immune cells to sites of infection. Especially, bacterial chemotaxis has utilized as an important prelude to study metabolism, prey-predator relationship, symbiosis, other ecological interactions in microbial communities. Recently, novel analytical formats integrated with microfluidics were introduced to investigate the chemotaxis of the cells with the precise control of chemical gradient and small volume of cells. In this study, we present a method to detect bacterial chemotaxis by direct fluidic contacting. The developed fluidic-handling method is driven by capillary force, hydrophobic barrier and a cohesion force between fluids. We have investigated the chemotactic response of *E. Coli.* and *Pseudomonas aeruginosa* to three kinds of chemoeffectors such as HEPES buffer, peptone and chloroform.

시 포획(trap)될 수 있는 기포를 제거하기 위하여 공기가 원활하게 외부로 배기되도록 air vent 채널이 형성되어 있다.



〈그림 1〉 제안된 주화성 검사용 마이크로플루이드칩의 개념도

1. 서 론

액체 내에서 운동성을 가지는 박테리아는 항상 자기 주변의 화학물질의 농도를 모니터링하면서 자신에게 이익이 된다고 판단하는 화학물질에는 모이고, 이익이 되지 않는다고 판단되는 화학물질로부터는 도망을 가는 행동학적 응답을 보이는데 이를 주화성이라고 한다[1]. 여러 세균 중에서 Bioremediation에 이용가능하다고 평가된 환경오염물질 분해 박테리아의 상당수는 *Pseudomonas*속과 유사한 박테리아 종으로 운동성을 가지고 있다. 이들의 특징은 환경오염물질에 대하여 정이나 부의 주화성 응답을 보이는 것인데 특히 자신이 분해가 가능한 오염물질에 대해서는 정주화성을 보이는 경우가 상당수 보고되어 있다[2]. 전통적인 박테리아의 주화성 검사법은 약물과 젤의 혼합물을 모세관에 주입한 후 이를 박테리아용액에 접촉시켜 반응시간에 따라 용액에 노출된 모세관의 끝부분에서 박테리아의 이동 여부를 분석하여 주화성의 양성반응과 음성반응을 검사한다. 이러한 방법은 항상 젤과 약물을 혼합해야하는 불편한 점과 세포의 개별적인 움직임이나 이동성을 관찰하기 어렵다. 현재까지의 마이크로플루이드칩 기반 주화성 검사실험은 연속 유동 흐름(continuous flow) 제어를 이용한다. 특히 Laminar flow를 유지하기 위해서 일정 이상의 유속이 필요하며 이는 미생물의 운동성을 방해하며 미생물 운동에 의한 정확한 주화성 분석을 해석하기 어렵다[3,4]. 본 연구에서는 H자형의 마이크로플루이드칩을 제작하여 모세관 현상과 소수성 패턴을 이용하여 두 종류 유체를 직접적으로 접촉시키는 유체조작기술을 개발하고, 박테리아의 주화성 분석에 응용하였다.

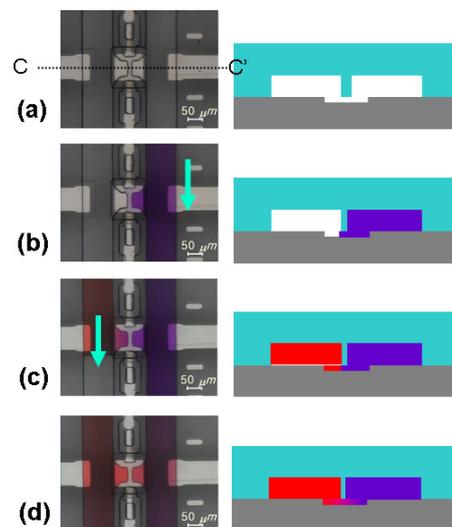
2. 실험

2.1 마이크로플루이드 칩의 기본 구조

발명된 칩의 구조는 H자 형태의 마이크로 채널 구조를 가지며, 정선 채널(junction channel) 양쪽의 주 채널(main channel)을 연결하고 있는 형태이다. 정선채널의 깊이는 사용된 세포의 크기의 90 ~ 110%의 깊이를 가지고 있다. <그림1>에서 나타내듯이 오른쪽의 마이크로 채널은 주화성샘플(chemoeffector)을 주입할 수 있으며, 왼쪽 마이크로 채널에는 검사하고자 하는 박테리아용액샘플을 주입할 수 있다. 가운데 연결된 정선채널에서 주화성샘플과 세포용액이 접촉하게 되며, 오른쪽 채널의 박테리아가 왼쪽의 채널로 확산되어 빠져 나가지 못하게 하는 역할을 한다. 정선채널의 양끝에는 주화성 샘플용액과 세포용액이 상호 접촉

2.2 유체 조작 방법

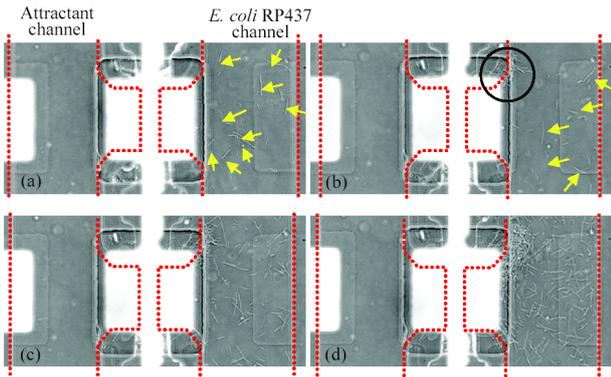
<그림 2>는 칼라잉크와 제작된 플루이드칩을 이용하여 주화성 검사샘플용액(chemoeffector)과 박테리아용액을 반응시키는 유체 조작 순서를 나타낸다. <그림 2(a)>에서 제작된 칩의 중심부의 현미경 사진을 나타내며 오른쪽의 도시된 그림은 C-C'의 단면을 나타낸다. 먼저 오른쪽 마이크로채널에 보라색잉크를(세포용액)을 모세관 현상에 의해서 채우게 된다 <그림 2(b)>. 이때 정선 채널의 중심에서 유체는 멈추게 된다. 그 다음 왼쪽의 마이크로 채널에 붉은색 잉크가 모세관 현상에 의해서 채워지게 되며 <그림 2(c)>, 정선 채널에서 이때 두 용액은 만나게 되며 확산 반응이 시작되게 된다(<그림 2(d)>).



〈그림 2〉 칼라잉크를 이용한 유체제어방법의 시현

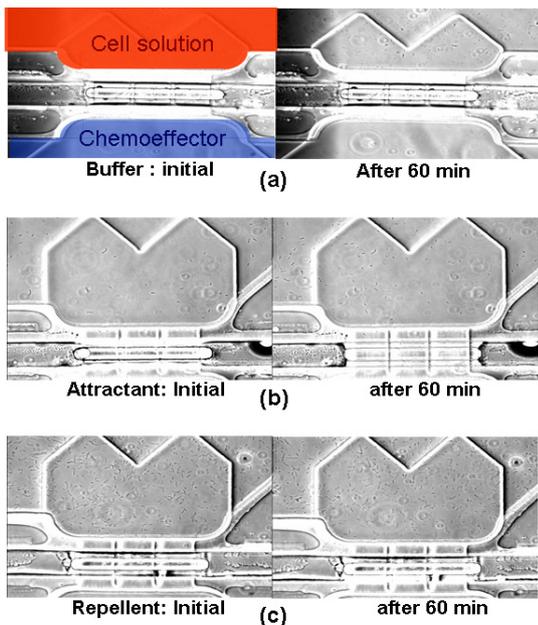
3. 결과 및 토의

<그림 3>은 1% peptone 용액에 대한 대장균(E. coli)의 주화성 검사 결과를 나타낸다. <그림 3>에서 설명된 유체조작법과 동일하게, 먼저 오른쪽 마이크로 채널에 대장균이 포함된 용액을 모세관 현상에 의해서 주입한 후, 왼쪽 마이크로 채널에 두 번째로 1% peptone 용액을 주입하였다. <그림 3>에서 빨간색 점선은 PDMS 폴리머 마이크로 채널의 경계를 나타내며, 검정색 원과 노란색 화살표는 대장균을 나타낸다. 실험결과로 알 수 있듯이, 대장균용액과 1% peptone용액 접촉한 직후의 대장균 초기 개체수보다 반응시간이 길어질수록 개체수가 증가함을 알 수 있다. 이는 1% peptone 용액에 대해서 대장균이 양성 반응을 보임을 알 수 있다. 하부 기판에 형성된 정선채널에서 1% peptone 용액과 대장균 용액간의 확산 반응은 진행 되지만, 대장균은 이동은 억제됨을 알 수 있다.



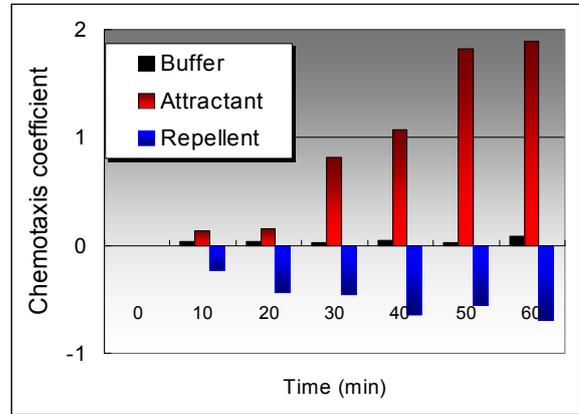
<그림 3> 대장균 E. coli의 1% Peptone 용액에 대한 주화성 검사 결과; (a) 반응직 후, (b) 20분 경과, (c) 40분경과, (d) 80분 경과.

<그림 4>는 Pseudomonas aeruginosa의 정선채널 부근의 개체수 60분 반응 전후의 사진을 나타낸다. Chemoeffector가 10 mM HEPES buffer (pH 7.2)인 경우(<그림 4(b)>) 개체수의 반응 전후 거의 변화가 없었으며, attractant용액인 1% peptone(attractant)인 60분 반응 후 개체수가 증가하였으며, 100 mM chloroform는 repellent 특성을 보이면서 개체수가 반응 직후에 비해 60분 반응 후 Pseudomonas aeruginosa수가 감소하는 경향을 보였다.



<그림 4> Pseudomonas aeruginosa의 주화성 검사 결과; (a) 10 mM HEPES buffer (pH 7.2)반응 직후와 60분 반응 후, (b) 1% peptone(attractant)반응 직후와 60분 반응 후, (c) 100 mM chloroform (repellent)반응 직후와 60분 반응 후.

<그림 5>는 초기 반응 직후 10분 간격으로 개체수를 세어 주화성계수 (chemotaxis coefficient)를 구하여 그래프로 나타내었다. HEPES buffer인 경우 계수 값의 변화가 거의 없음 알 수 있으며, 1% peptone (attractant)의 경우 양성반응을 보이며 30분후 계수의 값이 급격히 증가함을 알 수 있었다. Repellent로 작용하는 100 mM chloroform인 경우, 음성반응을 보이면서 20분까지 주화성 계수가 감소한 후, 30분 이후에는 계수 값의 변화가 미비함을 알 수 있었다. 이는 repellent의 반응의 우 박테리아의 증식대환 현상은 없음을 유추할 수 있다.



<그림 5> Pseudomonas aeruginosa의 반응 시간에 대한 주화성계수의 변화 (buffer: 10mM HEPES buffer (pH 7.2), attractant: 1% peptone, repellent: 100mM chloroform).

4. 결 론

본 연구에서는 H자형의 마이크로플루이딕칩 (microfluidic chip)제작하여 모세관 현상과 소수성 패턴을 이용하여 두 종류 유체를 직접적으로 접촉시키는 유체조작기술을 개발하고, 이를 이용한 박테리아의 주화성 분석에 응용하였다. HEPES buffer, peptone, chloroform을 chemoeffector로 사용하여 대장균과 Pseudomonas aeruginosa의 주화성을 분석하였으며, 각각의 chemoeffector에 대한 박테리아의 개체수의 증감에 대한 주화성 계수의 변화를 알 수 있었다. 실험 결과로부터 제안된 유체 조작 기술과 마이크로플루이딕 칩은 박테리아 주화성 분석에 매우 유용하게 쓰일 수 있다는 사실을 검증하였다.

5. 후 기

본 연구는 한국생산기술연구원 “환경/의료 산업을 위한 바이오필름 제어 융복합 플랫폼 기술 개발” 사업의 지원으로 수행되었음.

[참 고 문 헌]

[1] J. Adler, "Chemotaxis in bacteria," Science, **153**, 708-716 (1966).
 [2] G. Vardar, P. Barbieri and K. T. Wood, "Chemotaxis of Pseudomonas stutzeri OX1 and Burkholderia cepacia G4 toward chlorinated ethenes," Appl. Microbiol. Biotechnol. **66**, 696-701 (2005).
 [3] H. Mao, P. S. Cremer and M. D. Manson, "A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis," PNAS, **100**, 5449 (2003).
 [4] F. Lin and E. C. Butcher, "T cell chemotaxis in a simple microfluidic device," Lab Chip, **6**, 1462 (2006).