



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년08월25일  
 (11) 등록번호 10-1433091  
 (24) 등록일자 2014년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12M 1/34 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)  
 C12Q 1/24 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0043952  
 (22) 출원일자 2012년04월26일  
 심사청구일자 2012년04월26일  
 (65) 공개번호 10-2013-0120794  
 (43) 공개일자 2013년11월05일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 JP2006507815 A\*  
 KR100975611 B1\*  
 US6811968 B2  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 한국과학기술원  
 대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)  
 (72) 발명자  
 신현정  
 대전 유성구 대학로 291, (구성동, 한국과학기술원)  
 홍정우  
 대전 유성구 대학로 291, 기계공학동 2214호 (구성동, 한국과학기술원)  
 송석현  
 대전 유성구 대학로 291, 기계공학동 2214호 (구성동, 한국과학기술원)  
 (74) 대리인  
 이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

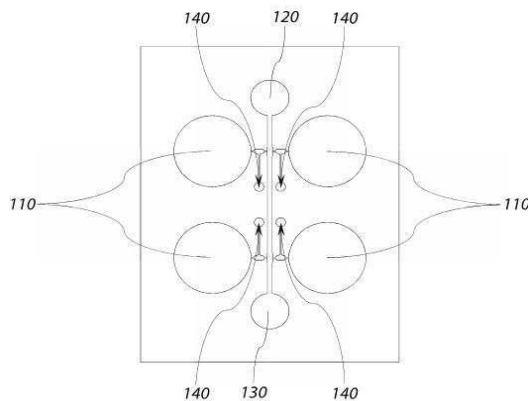
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치, 제조방법 및 이를 이용한 박테리아의 주화성 분석 방법**

**(57) 요약**

박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치, 제조방법 및 이를 이용한 박테리아의 주화성 분석 방법을 개시한다. 상기 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치는 외부로부터 제공되는 유리 하부기판; 상기 유리 하부기판 상에 접하도록 형성되는 PDMS 상부 기판;을 포함하며, 상부 기판은, 다종의 세포를 배양시키는 적어도 하나 이상의 세포 배양 챔버; 상기 PDMS 상부 기판 내에 형성되며, 외부로부터 제공되는 박테리아를 상기 상부 기판 내에 주입시키도록 형성된 박테리아 주입구; 외부로부터 제공되는 콜라겐 젤이 주입되는 적어도 한 개 이상의 콜라겐 젤 주입구;를 포함하며, 상기 PDMS 상부 기판은, 상기 세포 배양 챔버, 박테리아 주입 채널 입구, 박테리아 추출 채널 출구 및 콜라겐 젤 주입구가 연결시키는 미세 유로들가 형성되는 것을 특징으로 한다.

**대표도 - 도3**



이 발명을 지원한 국가연구개발사업  
과제고유번호 20110001655  
부처명 한국연구재단  
연구사업명 원천기술개발사업 미래유망융합기술과이오니어사업  
연구과제명 박테리아 운동성 및 지향성 분석  
기여율 1/1  
주관기관 한국과학기술원  
연구기간 2011.03.01 ~ 2012.02.29

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

외부로부터 제공되는 유리 하부기판;

상기 유리 하부기판 상에 접합되도록 형성되는 상부 기판;을 포함하며,

상부 기판은,

다종의 세포를 배양시키는 적어도 둘 이상의 세포 배양 챔버;

상기 상부 기판 내에 형성되며, 외부로부터 제공되는 박테리아를 상기 상부 기판 내에 주입시키도록 형성된 박테리아 주입구;

외부로부터 제공되는 콜라겐 젤이 주입되는 적어도 둘 이상의 콜라겐 젤 주입구;를 포함하며,

상기 상부 기판은,

상기 세포 배양 챔버, 박테리아 주입구 및 콜라겐 젤 주입구를 연결시키는 미세 유로가 형성되고,

상기 미세 유로는,

상기 박테리아 주입구와 연결되어 박테리아를 이동시키는 메인 유로; 및

상기 메인 유로와 연결되며, 상기 콜라겐 젤 주입구 및 상기 세포 배양 챔버와 연결된 서브 유로를 포함하며,

상기 서브 유로는,

상기 세포 배양 챔버 내의 세포와 상기 메인 유로 내에 이동되는 박테리아와의 주화성에 따른 세포 확산이 일어나는 확산 유로를 포함하고,

확산 유로의 끝단을 연장한 연장선과, 메인유로간의 각도는 110° 이상 180° 미만이며,

상기 확산유로 내부는 상기 콜라겐 젤 주입구로부터 주입된 콜라겐 젤로 채워지되, 상기 메인유로에는 콜라겐 젤이 유입되지 않는 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치.

**청구항 3**

제2항에 있어서,

상기 콜라겐 젤 주입구는,

상기 세포 배양 챔버의 갯수와 동일한 갯수로 형성되는 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

외부로부터 유리 하부기판을 제공하는 제1단계; 및

외부로부터 PDMS 상부 기판을 제작한 후, 산소 플라즈마 처리 공정을 통해 상기 유리 하부기판 상에 상기 PDMS 상부 기판을 접합시키는 제2단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제2항에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 제2단계는,

외부로부터 제공된 실리콘 웨이퍼에 황산과 과산화수소가 4:1 비율로 섞인 피라나용액(Piranha solution)으로 표면의 유기물질을 제거한 후, 스피너를 이용하여 음성 감광제 SU-8을 도포하는 도포 단계;

상기 도포 단계 이후, 소프트 베이크를 실시하여 상기 SU-8에 포함된 유기용제를 제거한 후, 노광과 포스트 베이크(post bake)를 통해 음성감광제의 레진 결합을 형성한 후, 하드 베이킹(hard baking) 공정을 수행하여, 상기 실리콘 웨이퍼 상에 미세 유로 패턴을 형성하는 패턴 형성 단계;

상기 미세 유로 패턴이 형성된 실리콘 웨이퍼 상에 PDMS와 경화제를 10:1 의 비율로 섞인 혼합용액을 부은 후, 경화시켜 PDMS 기판을 생성한 후, 세포 배양 챔버, 박테리아 주입구 및 콜라겐 젤 주입구를 형성하는 PDMS 상부 기판 생성 단계; 및

상기 유리 하부기판과 상기 PDMS 상부 기판을 산소플라즈마 처리하여 접합시키는 접합 단계를 포함하는 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 PDMS 상부 기판 생성 단계는,

상기 혼합용액을 70°C의 온도로 3시간 동안 경화시키는 단계인 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조방법.

### 청구항 9

제7항에 있어서,

상기 접합 단계는,

상기 산소 플라즈마를 200W의 전력으로, 2분 30초 동안 처리하여, 상기 유리 하부기판 상에 상기 PDMS 상부 기판을 접합시키는 단계인 것을 특징으로 하는 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조방법.

### 청구항 10

콜라겐 젤 주입구 내에 콜라겐 젤을 주입시켜 확산 유로 내부를 채우는 콜라겐 젤 주입단계;

세포 배양 챔버 내에 세포를 배양시키는 세포 배양 단계;

박테리아 주입구 내에 연록 형광 단백질이 수식화된 박테리아를 주입시키는 단계; 및

확산 유로 내로 확산된 박테리아의 주화성 정도를 상기 확산 유로 내에 위치한 세포중에 대한 박테리아의 형광 발기를 통해 주화성을 분석하는 단계를 포함하는, 제2항에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치를 이용한 주화성 분석 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 플루이딕 장치에 관한 것으로, 보다 상세하게는 다종의 세포가 하나의 기관에서 공생배양되고, 이를 통해 분비되는 물질들을 이용하여 실시간으로 주화성 환경을 조성할 수 있는 독립적인 배양 공간과 이를 물리적으로 분리하기 위한 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치, 제조방법 및 이를 이용한 박테리아의 주화성 분석 방법을 제공하는 것이다.

배경기술

[0002] 박테리아는 특정한 물질이나 환경 조건의 농도 구배가 존재하는 상황에서 선호하는 물질이나 환경 방향으로 이동하거나 혐오하는 물질이나 환경의 반대 방향으로 이동하는 특성을 가지고 있다. 이러한 박테리아의 특성을 주성이라 하는데, 생화학적 물질의 구배에 따라 이동하는 현상을 주화성이라 한다.

[0003] 19세기 부터 박테리아는 암 조직 또는 세포에 대해 주화성을 보이는 것을 관찰하였고, 이러한 현상을 이용하여 암을 치료하고자 하는 노력은 지속되어왔다. 이러한 노력에 불구하고 박테리아가 암을 찾아내는 직접적인 원인은 아직 밝혀지지 않았다. 박테리아를 치료 목적으로 사용하기 위해서는 박테리아가 암을 선호하는 현상에 대한 명확한 원인을 밝혀 박테리아로 인한 부작용에 대해 대비할 수 있어야 한다.

[0004] 박테리아가 암을 선호하는 원인은 크게 암 조직 원활하지 못한 산소 공급을 인해 발생하는 산소 결핍 환경과 박테리아가 암 세포에서 특이적으로 분비되는 생화학적 물질에 대해 보이는 주화성이라 추정하고 있다.

[0005] 암 세포는 암 조직으로서의 비정상적인 빠른 증식으로 인해 균일하지 않은 산소와 영양분 공급이 발생하여 조직 내부에는 괴저성의 산소 결핍 부위가 발생한다.

[0006] 암 조직에 대한 주화성을 보이는 박테리아는 보통 혐기성 박테리아로 알려져 있어 암 조직에 대한 박테리아의 주화성은 조직 내부의 산소 결핍 환경에 의한 것이라 자연스럽게 추측할 수 있다.

[0007] 하지만 암 세포는 조직으로서의 빠른 증식을 위해 정상 세포에서 일반적으로 발현되지 않는 암 특이적인 생화학적 물질들을 지속적으로 다량 분비하게 되는데, 만약 박테리아가 암을 지향하는 원인이 이러한 생화학적 물질이라면, 이를 분석하기 위해 실시간으로 분비되는 물질들에 대한 농도 구배 환경을 이루고 주화성을 분석할 수 있는 조건을 구성해야한다.

[0008] 또한 암 세포 특이적인 물질에 대한 지향성이라는 것을 확인하기 위해서는 정상 세포와 암세포가 같은 조건으로 함께 배양되는 환경에서 박테리아의 지향성을 확인해야 한다. 따라서 두 가지 이상의 세포를 하나의 환경에서 동시에 공생 배양할 수 있는 조건도 함께 구비되어야 한다.

[0009] 주화성을 확인하기 위한 가장 기초적인 방법으로는 모세관을 이용한 분석법이 있다.

[0010] 도 1은 종래 기술에 따른 박테리아의 주화성 분석법을 나타낸 도면이며, 도 2는 종래 기술에 따른 마이크로 플루이딕 장치 기반의 주화성 분석법을 나타낸 도면이다.

[0011] 도 1에 도시된 바와 같이, 특정 물질이 삽입된 모세관을 박테리아 용액에 넣어 확산을 통해 농도 구배가 발생하고 이에 대한 박테리아의 주화성을 분석하게 된다.

[0012] 하지만 이러한 방법은 주화성을 판단할 수 있는 기준이 정성적인 방법을 통해 이루어져 정확한 분석보다는 경향을 파악하는 정도에 그칠 수밖에 없다. 또한 동시에 다수의 샘플을 분석하기 어렵다.

[0013] 박테리아의 주화성 분석을 위해 제시된 다른 방법으로 텍사스 A&M 대학 화학공학과 Jayaraman 교수가 발표한 마

이크로 플루이딕 장치가 있다.

[0014] 도 2에 도시된 바와 같이, 주화성을 확인하고자 하는 두 가지의 용액을 농도 구배 형성 채널(gradient generator)을 통해 주입하여 주화성 확인 챔버(chemotaxis chamber) 내에 안정된 농도 구배가 이뤄지게 한다.

[0015] 박테리아는 주화성 확인 챔버 상부에서 주입되어 챔버 내부에서의 움직임을 통해 주화성을 분석할 수 있게 한다. 이 방법은 하나의 소형 기관에 모든 구성 요소를 가지고 있어 분석이 용이할 수 있지만, 안정된 농도 구배 형성을 위해 연속 유동 흐름을 요하고, 이에 따라 실험이 진행되는 동안 다량의 배양액이 필요하다. 또한 이러한 연속 유동은 박테리아와 높은 운동성을 가진 생물을 분석할 때, 의도하지 않은 영향을 미칠 수 있다.

[0016] 공생 배양은 2종 이상의 세포를 혼합 배양하는 것으로 2종 이상의 세포를 같은 환경에서 직접적으로 비교하기 위해 보통 이 방법이 사용된다. 하지만 만약 분석 대상 세포들의 배양액이 다를 경우, 이러한 공생 배양이 어려워진다. 이러한 모든 세포들이 자랄 수 있는 하나의 배양액을 선택해야 하는데, 이 경우 종래의 배양액을 사용하지 못하게 되는 경우가 발생하며 정상적인 배양을 통해서만 발생할 수 있는 조건 및 물질들에 대한 영향을 배제해야 한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0017] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 다종의 세포가 하나의 기관에서 공생배양되면서 발생하는 생화학적 물질들에 대한 실시간 농도 구배 환경을 만들어 정량적인 방법으로 박테리아의 주화성을 평가할 수 있는 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치, 제조 방법 및 이를 이용한 박테리아의 주화성 분석 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0018] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 실시 예에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치는 세포 등에서 분비되는 물질들을 이용하여 실시간으로 주화성 환경을 조성할 수 있는 독립적인 배양 공간과 이를 물리적으로 분리하기 위한 콜라겐 젤 주입구, 박테리아를 주입할 수 있는 채널로 구성되는 것을 특징으로 한다.

[0019] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 실시 예에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치는 외부로부터 제공되는 유리 하부기관; 상기 유리 하부기관 상에 접하도록 형성되는 PDMS 상부 기관;을 포함하며, 상기 PDMS 상부 기관은, 다종의 세포를 배양시키는 적어도 하나 이상의 세포 배양 챔버; 상기 상부 기관 내에 형성되며, 외부로부터 제공되는 박테리아를 상기 상부 기관 내에 주입시키도록 형성된 박테리아 주입구; 외부로부터 제공되는 콜라겐 젤이 주입되는 적어도 한 개 이상의 콜라겐 젤 주입구;를 포함하며, 상기 상부 기관은, 상기 세포 배양 챔버, 박테리아 주입구 및 콜라겐 젤 주입구가 연결시키는 미세 유로들이 형성되는 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기 콜라겐 젤 주입구는, 상기 세포 배양 챔버의 갯수와 동일한 갯수로 형성되는 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 미세 유로는, 상기 박테리아 주입구와 연결되어 박테리아를 이동시키는 메인 유로; 및 상기 메인 유로와 연결되며, 상기 콜라겐 젤 주입구 및 상기 세포 배양 챔버와 연결된 서브 유로를 포함하며, 상기 서브 유로는, 상기 세포 배양 챔버 내의 세포와 상기 메인 유로 내에 이동되는 박테리아와의 주화성에 따른 세포 확산이 일어나는 확산 유로를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0022] 상기 확산 유로의 양 끝단은, 적어도 110° 내지 180° 미만의 각으로 형성되는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 실시 예에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조방법은 외부로부터 유리 하부기판을 제공하는 제1단계; 및 외부로부터 PDMS 상부 기판을 제작한 후, 산소 플라즈마 처리 공정을 통해 상기 유리 하부기판 상에 상기 PDMS 상부 기판을 접합시키는 제2단계를 포함한다.
- [0024] 상기 제2단계는 외부로부터 제공된 실리콘 웨이퍼에 황산과 과산화수소가 4:1 비율로 섞인 피라냐용액(Piranha solution)으로 표면의 유기물질을 제거한 후, 스핀코터를 이용하여 음성 감광제 SU-8을 도포하는 도포 단계; 상기 도포 단계 이후, 소프트 베이킹을 실시하여 상기 SU-8에 포함된 유기용제를 제거한 후, 노광과 포스트 베이킹(post bake)를 통해 음성감광제의 레진 결합을 형성한 후, 하드 베이킹(hard baking) 공정을 수행하여, 상기 실리콘 웨이퍼 상에 미세 유로 패턴을 형성하는 패턴 형성 단계; 상기 미세 유로 패턴이 형성된 실리콘 웨이퍼 상에 PDMS와 경화제를 10:1의 비율로 섞인 혼합용액을 부은 후, 경화시켜 PDMS 기판을 생성한 후, 세포 배양 챔버, 박테리아 주입구 및 콜라겐 젤 주입구를 형성하는 PDMS 상부 기판 생성 단계; 및 상기 유리 하부기판과 상기 PDMS 상부 기판을 산소플라즈마 처리하여 접합시키는 접합 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 상기 PDMS 상부 기판 생성 단계는, 상기 혼합용액을 70℃의 온도로 3시간 동안 경화시키는 단계인 것을 특징으로 한다.
- [0026] 상기 접합 단계는, 상기 산소 플라즈마를 200W의 전력으로, 2분 30초 동안 처리하여, 상기 유리 하부기판 상에 상기 PDMS 상부 기판을 접합시키는 단계인 것을 특징으로 한다.
- [0027] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 실시 예에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치를 이용한 박테리아의 주화성 분석 방법은 콜라겐 젤 주입구 내에 콜라겐 젤을 주입시켜 확산 유로 내부를 채우는 콜라겐 젤 주입단계; 세포 배양 챔버 내에 세포를 배양시키는 세포 배양 단계; 박테리아 주입구 내에 연록 형광 단백질이 수식화된 박테리아를 주입시키는 단계; 및 확산 유로 내로 확산된 박테리아의 주화성 정도를 상기 확산 유로 내에 위치한 세포중에 대한 박테리아의 형광 밝기를 통해 주화성을 분석하는 단계를 포함한다.

**발명의 효과**

- [0028] 본 발명에 따르면 하나의 기판에서 2 종 이상의 세포를 각기 독립된 공간에서 각기 사용되는 종래의 배양액을 이용하여 장시간 배양할 수 있으며, 이에 따라 분비되는 생화학적 물질들에 대한 실시간 농도 구배를 형성할 수 있는 이점이 있다. 또한, 다수의 샘플을 형광의 정도를 비교하는 정량적인 방법을 통해 보다 명확하고 객관적으로 분석할 수 있는 장점이 있다.
- [0029] 상세하게는, 첫째, 세포 배양 챔버와 박테리아 주입 채널 사이에 주입된 콜라겐 젤은 견고한 물리적인 벽을 형성하여 각 배양액이 박테리아 주입 채널이나 이중 세포 배양 챔버에 섞이지 않도록 독립적인 배양 공간을 제공한다.
- [0030] 둘째, 벽을 형성하는 콜라겐 젤의 다공성 성질을 이용하여 장시간의 배양을 세포에서 분비되는 다양한 생화학적 물질들이 확산을 통해 박테리아 채널로 실시간 농도 구배를 형성하여 박테리아의 주화성을 분석할 수 있다.
- [0031] 셋째, 정지된 흐름에서 분석이 진행되기 때문에 박테리아의 주화성을 운동성에 영향을 미치지 않고 수행할 수 있으며, 배양액 등의 시약의 사용을 수백  $\mu$ l 이하로 줄일 수 있다.
- [0032] 넷째, 연록 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)이 수식화된 박테리아를 이용하여 일정한 시간 후에 박테리아의 형광의 밝기를 비교하면 객관적이며 정량적인 분석이 가능하다.
- [0033] 다섯째, 제작 공정은 종래의 소프트 리소그래피(soft lithography) 방법을 이용함으로 단순하며 저가로 제작할

수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0034] 도 1은 종래 기술에 따른 박테리아의 주화성 분석법을 나타낸 도면이다.
- 도 2는 종래 기술에 따른 마이크로 플루이딕 장치 기반의 주화성 분석법을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 상부 기관을 나타낸 평면도이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 사시도이다.
- 도 5는 본 발명에 속한 박테리아의 주화성 분석 영역을 확대한 마이크로 플루이딕 장치의 부분 사시도이다.
- 도 6은 본 발명에 속한 박테리아의 주화성 분석 영역을 나타낸 평면도이다.
- 도 7은 도 6의 콜라겐 젤 주입 영역 끝단을 확대한 사시도이다.
- 도 8a는 채널 형상 계수 및 접촉각도에 따른 확장채널에서의 이론적 모세관 압력을 수학적식으로 나타내기 위한 예시도이다.
- 도 8b는 도 8a에 기재된 이론적 모세관 압력을 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 실시 예에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조 방법을 나타낸 플로우 차트이다.
- 도 10은 도 9에 도시된 제2단계를 보다 구체적으로 나타낸 플로우 차트이다.
- 도 11은 본 발명에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조 공정도를 나타낸 순서도이다.
- 도 11은 본 발명에 따른 실시 예로 간 압과 정상세포의 형광 살모넬라 주화성 분석 과정을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- 도 12은 본 발명에 따른 실시 예로 살모넬라 주화성 결과 분석 방법을 나타낸 표이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0035] 본 명세서 또는 출원에 개시되어 있는 본 발명의 개념에 따른 실시 예들에 대해서 특정한 구조적 내지 기능적 설명들은 단지 본 발명의 개념에 따른 실시 예를 설명하기 위한 목적으로 예시된 것으로, 본 발명의 개념에 따른 실시 예들은 다양한 형태로 실시될 수 있으며 본 명세서 또는 출원에 설명된 실시 예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.
- [0036] 본 발명의 개념에 따른 실시 예는 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있으므로 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 본 명세서 또는 출원에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명의 개념에 따른 실시 예를 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0037] 제1 및/또는 제2 등의 용어는 다양한 구성 요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성 요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안된다. 상기 용어들은 하나의 구성 요소를 다른 구성 요소로부터 구별하는 목적으로만, 예컨대 본 발명의 개념에 따른 권리 범위로부터 이탈되지 않은 채, 제1 구성요소 제2 구성요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제2 구성요소는 제1 구성요소로도 명명될 수 있다.
- [0038] 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "연결되어" 있다거나 "접속되어" 있다고 언급된 때에는, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.
- [0039] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 실시된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품



또는 이들을 조합하는 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [0040] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시 예를 설명함으로써, 본 발명을 상세히 설명한다. 이하에서는 도면을 참조하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0041] 도 3은 본 발명에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 상부 기관을 나타낸 평면도이며, 도 4는 본 발명에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 사시도이며, 도 5는 본 발명에 속한 박테리아의 주화성 분석 영역을 확대한 마이크로 플루이딕 장치의 부분 사시도이며, 도 6은 본 발명에 속한 박테리아의 주화성 분석 영역을 나타낸 평면도이며, 도 7은 도 6의 콜라겐 젤 주입 영역 끝단을 확대한 사시도이다.
- [0042] 도 3에 도시된 바와 같이, 본 발명의 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치(1000)는 세포 등에서 분비되는 물질들을 이용하여 실시간으로 주화성 환경을 조성할 수 있는 독립적인 배양 공간과 이를 물리적으로 분리하기 위한 콜라겐 젤 주입구, 박테리아를 주입할 수 있는 채널로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [0043] 보다 상세하게, 상기 장치(1000)는 유리 하부기관(200) 및 PDMS 상부 기관(100)을 포함한다.
- [0044] 상기 PDMS 상부 기관(100)은 상기 유리 하부기관(200) 상에 접하도록 형성된다.
- [0045] 상기 PDMS 상부 기관(200)은 박테리아 주입구(120,130), 콜라겐 젤 주입구(140), 세포 배양 챔버(110)를 포함한다.
- [0046] 상기 세포 배양 챔버(110)는 다종의 세포를 배양시킨다.
- [0047] 상기 박테리아 주입구(120, 130)는 상기 PDMS 상부기관(100) 내에 형성되며, 외부로부터 제공되는 박테리아를 주입시키도록 형성된다.
- [0048] 상기 콜라겐 젤 주입구(140)는 외부로부터 제공되는 콜라겐 젤이 주입되며, 상기 PDMS 상부 기관(100) 내에 적어도 한 개 이상 형성된다.
- [0049] 이때, 상기 PDMS 상부 기관(100)은 상기 세포 배양 챔버(110), 박테리아 주입구(120, 130) 및 콜라겐 젤 주입구(140)를 연결시키는 미세 유로가 형성된다.
- [0050] 상기 PDMS 상부 기관(100)과 상기 유리 하부기관(200)은, 산소 플라즈마 처리 공정을 통해 접합된다.
- [0051] 상기 콜라겐 젤 주입구(140)는, 상기 세포 배양 챔버(110)의 갯수와 동일한 갯수로 형성된다.
- [0052] 상기 미세 유로는 상기 박테리아 주입구(120, 130)와 연결되어 박테리아를 이동시키는 메인 유로 및 상기 메인 유로와 연결되며, 상기 콜라겐 젤 주입구(140) 및 상기 세포 배양 챔버(110)와 연결된 서브 유로를 포함하며, 상기 서브 유로는, 상기 세포 배양 챔버(110) 내의 세포와 상기 메인 유로 내에 이동되는 박테리아와의 주화성에 따른 세포 확산이 일어나는 확산 유로(141)를 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 확산 유로(141)의 양 끝단은, 적어도 110° 내지 180° 미만의 각으로 형성될 수 있다.
- [0054] 보다 구체적으로, 상기 확산 유로의 각은 바람직하게는 110° 로 형성되며, 이는 수동적으로 콜라겐 젤의 유동을 멈추게 하여 제어된 형태의 콜라겐 젤 벽을 형성하도록 유도하기 위함이다.
- [0055] 참고로, 도 8a는 채널 형상 계수 및 접촉각도에 따른 확장채널에서의 이론적 모세관 압력을 수학적식으로 나타내기 위한 예시도이며, 도 8b는 도 8a에 기재된 이론적 모세관 압력을 나타낸 그래프이다.
- [0056] 도 8a를 참조하면, 높이가 일정한 채널이 확장하는 형상에서 유체의 진행을 나타낸 것으로, 확장 지점에서 모세관 유동이 가지는 압력은 아래의 수학적 식 1과 같이 표현될 수 있다.

[0057] [수학식 1]

$$P_n = 2\sigma \cdot \left( \frac{\sin \alpha}{\alpha} \right) \cdot \left\{ \frac{\cos \theta}{h} + \frac{\cos(\theta + \beta)}{w} \right\}$$

$$\alpha = \theta + \beta - \frac{\pi}{2}$$

[0058]

[0059] 여기서,  $\theta$ 는 접촉각,  $\beta$ 는 채널 확장 각도,  $\sigma$ 는 표면장력계수,  $\alpha$ 는 유체계면의 곡률반경이다.

[0060] 모세관 압력( $P_n$ )은 아래의 수학식 2와 같이 다시 나타낼 수 있다.

[0061] [수학식 2]

$$P_n = \sigma \cdot \left( \frac{\sin \alpha}{\alpha} \right) \cdot \left\{ \frac{\cos \theta + \cos \theta_i}{h} + \frac{2 \cos(\theta + \beta)}{w} \right\}$$

[0062]

[0063] 채널이 형성되는 PDMS 상부 기관과 유리 하부기관의 재질이 달라서 접촉각이 각각  $\theta$ 와  $\theta_i$ 인 경우 압력은 다음과 같다. 이때, 모세관 압력  $P_n$ 이 음의 값을 가지면 확장지점에서 모세관 유동은 정지하며 양의 값을 가지면 유동이 진행하게 됨을 알 수 있다.

[0064] 도 8b를 참조하면, 높이가 일정한 경우 모세관의 폭이 작을 수록 큰 정지압력을 가지며 특정한 확장각도에서 최대의 정지압력이 나타남을 알 수 있다.(여기서, 모세관의 폭( $h$ )는  $100\mu\text{m}$ 이며, 확장 각도( $\theta$ )는  $70^\circ$ 이다.)

[0065] 또한 채널의 접촉각이 다른 경우에도 수학식 1을 이용해 쉽게 정지 압력의 변화를 살펴볼 수 있다.

[0066] 즉, 본 발명의 장치(1000)는 2종 이상의 세포가 배양을 통해 발현하는 각기 다른 생화학적 물질들에 대한 박테리아의 주화성을 정량적인 방법으로 분석하기 위한 장치로서, PDMS 재질의 상부 기관(100)과 유리 재질의 하부 기관(200)으로 구성되는데, 상기 PDMS 상부 기관(100)에 주화성 분석을 위한 모든 구성요소가 단층의 채널(예컨대, 미세유로)로 설계되어 있다.

[0067] PDMS 상부 기관(100)은 유리 하부기관(200)과 접합되어 일체화될 수 있도록 산소 플라즈마로 일정한 전력에서 일정한 시간동안 처리하여 이루어진다. 이때 상기 접합은 산소플라즈마 200W로 2분 20초 동안 처리한 후에 접하는 것이 바람직하다.

[0068] 상기 PDMS 상부 기관(100)에는 다종의 세포가 배양될 수 있는 세포 배양 챔버(110)와, 박테리아가 주입될 수 있는 박테리아 주입구(120, 130), 또한 이 두 요소들을 물리적으로 분리할 수 있는 콜라겐 젤 주입구(140)가 구비되어 있다. 이러한 구성 요소들은 별도의 처리없이 하나의 채널로 구성되어 있어 매우 간단한 MEMS 공정을 통해 제작될 수 있다.

[0069] 본 발명에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치를 이용하여 박테리아의 주화성을 분석 과정은 다음과 같다. 마이크로 플루이딕 장치 내부에 콜라겐 젤 주입을 통해 형성된 독립된 공간에서 각기 다른 배양액을 사용하는 2 개 이상의 세포주를 일정시간 배양한다.

[0070] 이때, 콜라겐 젤 주입구 설계에 있어 채널의 형상을 조정하여 지정된 위치에만 콜라겐 젤(141)이 채워질 수 있도록 하였다. 도 6을 참조하면 모세관력과 표면장력이 지배하는 마이크로 단위의 유동에서 채널의 형상이  $90^\circ$  이상으로 급격히 확장할 때 유동이 멈추게 되는 현상을 이용하여 콜라겐 세포 배양 챔버와 박테리아 주입 채널을 연결하는 콜라겐 젤 주입 부분 양 끝단에는 그 폭이 급격히 확장하는 형태의 채널 형상을 설계하여 주입시 수동적으로 젤의 유동을 멈추게 하여 제어된 형태의 콜라겐 젤 벽을 형성하도록 유도하였다. 이때 채널이 확장하는 각도는 안정된 유동의 제어를 위해  $110^\circ$  이상 내지  $180^\circ$  미만으로 설계하는 것이 바람직하다.(도 7참조)

[0071] 세포가 배양되는 동안 박테리아 주입 중앙 채널은 아무것도 채워지지 않은 상태에서 세포에서 분비되는 생화학

적 물질들은 콜라겐 젤 내부로 확산된다.

- [0072] 일정시간 이후 박테리아를 중앙 채널에 주입하여 중앙채널과 연결되어 있는 콜라겐 젤 끝단에서의 생화학적 물질들의 확산에 의해 형성된 농도 구배를 이용해 박테리아의 주화성을 분석한다.
- [0073] 이때, 사용되는 박테리아는 정량적인 분석을 위해 연록 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)와 같은 물질을 수식화하여 주화성 분석시 특정 방향으로 몰린 박테리아의 수를 짐작하여 판단하지 않고 형광 현미경을 사용하여 검출 부위(도 6을 참조)의 일정한 노출 시간을 부여한 형광 사진을 찍고 이에 형광 밝기를 그래픽 소프트웨어를 통해 정량적으로 비교하여 분석을 수행한다.
- [0074] 도 9는 본 발명의 실시 예에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조 방법을 나타낸 플로우 차트이며, 도 10은 도 9에 도시된 제2단계를 보다 구체적으로 나타낸 플로우 차트이며, 도 11은 본 발명에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조 공정도를 나타낸 순서도이다.
- [0075] 도 9 내지 도 11에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시 예에 따른 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이딕 장치의 제조 방법(S100)은 제1단계(S110) 및 제2단계(S120)를 포함한다.
- [0076] 상기 제1단계(S110)는 외부로부터 유리 하부기판을 제공 단계이다.
- [0077] 상기 제2단계(S120)는 외부로부터 PDMS 상부 기판을 제작한 후, 산소 플라즈마 처리 공정을 통해 상기 유리 하부기판 상에 상기 PDMS 상부 기판을 접합시키는 단계이다.
- [0078] 보다 구체적으로, 상기 제2단계(S120)는 도포 단계(S121), 패턴 형성 단계(S122), PDMS 상부 기판 생성 단계(S123) 및 접합 단계(S124)를 포함한다.
- [0079] 상기 도포 단계(S121)는 외부로부터 제공된 실리콘 웨이퍼에 황산과 과산화수소가 4:1 비율로 섞인 피라냐용액(Piranha solution)으로 표면의 유기물질을 제거한 후, 스핀코터를 이용하여 음성 감광제 SU-8을 도포하는 단계일 수 있다.
- [0080] 상기 패턴 형성 단계(S122)는 상기 도포 단계 이후, 소프트 베이크를 실시하여 상기 SU-8에 포함된 유기용제를 제거한 후, 노광과 포스트 베이크(post bake)를 통해 음성감광제의 레진 결합을 형성한 후, 하드 베이킹(hard baking) 공정을 수행하여, 상기 실리콘 웨이퍼 상에 미세 유로 패턴을 형성하는 단계일 수 있다.
- [0081] 상기 PDMS 상부 기판 생성 단계(S123)는 상기 미세 유로 패턴이 형성된 실리콘 웨이퍼 상에 PDMS와 경화제를 10:1의 비유로 섞인 혼합용액을 부은 후, 경화시켜 PDMS 기판을 생성한 후, 세포 배양 챔버, 박테리아 주입구 및 콜라겐 젤 주입구를 형성하는 단계일 수 있다.
- [0082] 상기 접합 단계(S124)는 상기 유리 하부기판과 상기 PDMS 상부 기판을 산소플라즈마 처리하여 접합시키는 단계일 수 있다.
- [0083] 여기서, 상기 PDMS 상부 기판 생성 단계(S123)는, 상기 혼합용액을 70℃의 온도로 3시간 동안 경화시키는 단계일 수 있으며, 상기 접합 단계(S124)는 상기 산소 플라즈마를 200W의 전력으로, 2분 30초 동안 처리하여, 상기 유리 하부기판 상에 상기 PDMS 상부 기판을 접합시키는 단계일 수 있다.
- [0084] 도 12는 본 발명에 따른 실시 예로 간 암과 정상세포의 형광 살모넬라 주화성 분석 과정을 개략적으로 나타낸 모식도이며, 도 13은 본 발명에 따른 실시 예로 살모넬라 주화성 결과 분석 방법을 나타낸 표이다.
- [0085] 도 12에 도시된 바와 같이, 콜라겐 젤 주입구(140)를 통해 주입된 콜라겐 젤로 인해 독립적 배양 공간이 제공된 상기 마이크로 플루이딕 장치 세포 배양 챔버(110)에 각각 간 암세포와 간 정상세포를 일정시간 배양하고 중앙 박테리아 주입구(120)를 통해 주입된 형광 박테리아가 주입되어 분석을 진행하였다.
- [0086] 도 13을 참조하면, 본 발명을 이용한 분석결과를 나타낸 것으로 분석 영역(도 6)에 일정 노출 시간(200 ms)의 형광 사진을 찍고 이 부분에 대한 형광의 밝기를 수치적으로 비교하여 특정 세포종에 대한 박테리아의 주화성을 분석할 수 있다.
- [0087] 따라서, 본 발명에 따르면 세포 배양 챔버로 주입되는 세포와 배양액은 견고한 벽을 이루는 콜라겐 젤로 인해 독립적인 공간에서 장시간 배양 이 가능하게되고 이에 따라 발생하는 생화학적 물질들은 다공성의 콜라겐 젤 내

부로 확산되게 한다.

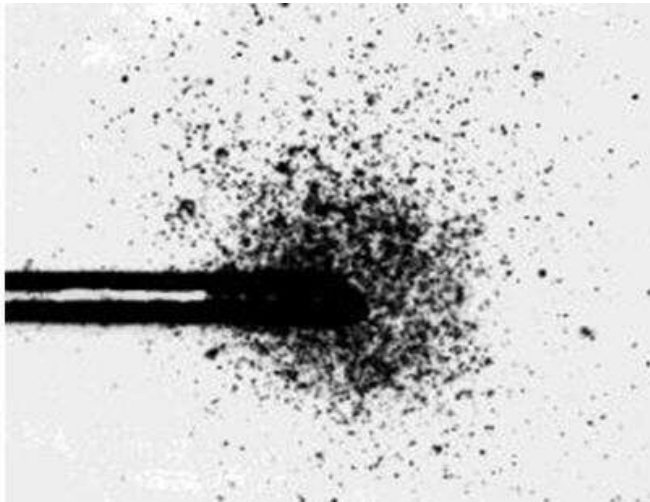
- [0088] 이러한 상기 PDMS 상부 기관과 유리기관이 일체화되는 상태에서 각 세포 배양 챔버에서 2종 이상의 세포가 독립적으로 배양되고 중앙의 박테리아 주입 채널에 박테리아 용액이 주입되면 각 콜라겐 젤 끝단에서부터 확산되는 생화학적 물질에 대한 박테리아의 주화성을 분석하게 되는 것이다.
- [0089] 이때, 보다 더 객관적인 정량적 분석을 위해 연록 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP) 수식화된 박테리아를 이용하여 주화성의 정도를 각 위치에 모인 박테리아로 인해 발생하는 형광의 밝기를 측정하여 판단하게 된다.
- [0090] 본 발명에 따르면 하나의 기관에서 2종 이상의 세포를 각기 독립된 공간에서 각기 사용되는 종래의 배양액을 이용하여 장시간 배양할 수 있으며, 이에 따라 분비되는 생화학적 물질들에 대한 실시간 농도 구배를 형성할 수 있는 이점이 있다. 또한, 다수의 샘플을 형광의 정도를 비교하는 정량적인 방법을 통해 보다 명확하고 객관적으로 분석할 수 있는 장점이 있다.
- [0091] 상세하게는, 첫째, 세포 배양 챔버와 박테리아 주입 채널 사이에 주입된 콜라겐 젤은 견고한 물리적인 벽을 형성하여 각 배양액이 박테리아 주입 채널이나 이중 세포 배양 챔버에 섞이지 않도록 독립적인 배양 공간을 제공한다.
- [0092] 둘째, 벽을 형성하는 콜라겐 젤의 다공성 성질을 이용하여 장시간의 배양을 세포에서 분비되는 다양한 생화학적 물질들이 확산을 통해 박테리아 채널로 실시간 농도 구배를 형성하여 박테리아의 주화성을 분석할 수 있다.
- [0093] 셋째, 정지된 흐름에서 분석이 진행되기 때문에 박테리아의 주화성을 운동성에 영향을 미치지 않고 수행할 수 있으며, 배양액 등의 시약의 사용을 수백 μl이하로 줄일 수 있다.
- [0094] 넷째, 연록 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)이 수식화된 박테리아를 이용하여 일정한 시간 후에 박테리아의 형광의 밝기를 비교하면 객관적이며 정량적인 분석이 가능하다.
- [0095] 다섯째, 제작 공정은 종래의 소프트 리소그래피(soft lithography) 방법을 이용하므로 단순하며 저가로 제작할 수 있다.
- [0096] 상기와 같은 본 발명은 박테리아의 주화성 분석용 마이크로 플루이드 장치, 제조방법 및 이를 이용한 박테리아의 주화성 분석 방법에 대한 실시 구성에 있어 다양하게 변형될 수 있고 여러 가지 형태를 취할 수 있다. 하지만, 본 발명은 상기의 상세한 설명에서 언급되는 특별한 형태로 한정되는 것이 아니며, 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 정신과 범위 내에 있는 모든 변형물과 균등물 및 대체물을 포함하는 것을 이해되어야 한다.

**부호의 설명**

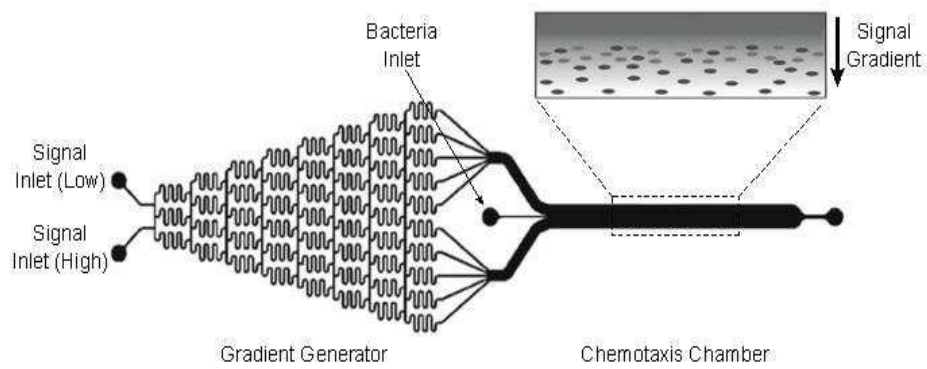
- [0097] 100: PDMS 상부 기관    110: 다중 세포 배양 챔버
- 120, 130: 박테리아 주입구                                        140: 콜라겐 젤 주입구
- 141: 확산 유로    200: 유리 하부 기관
- 1000: 플루이드 장치

도면

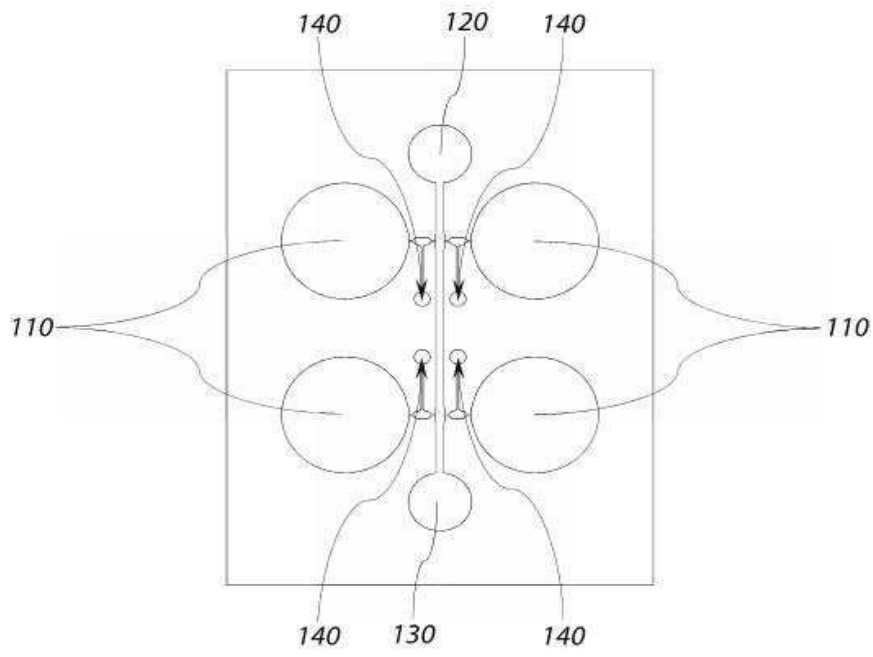
도면1



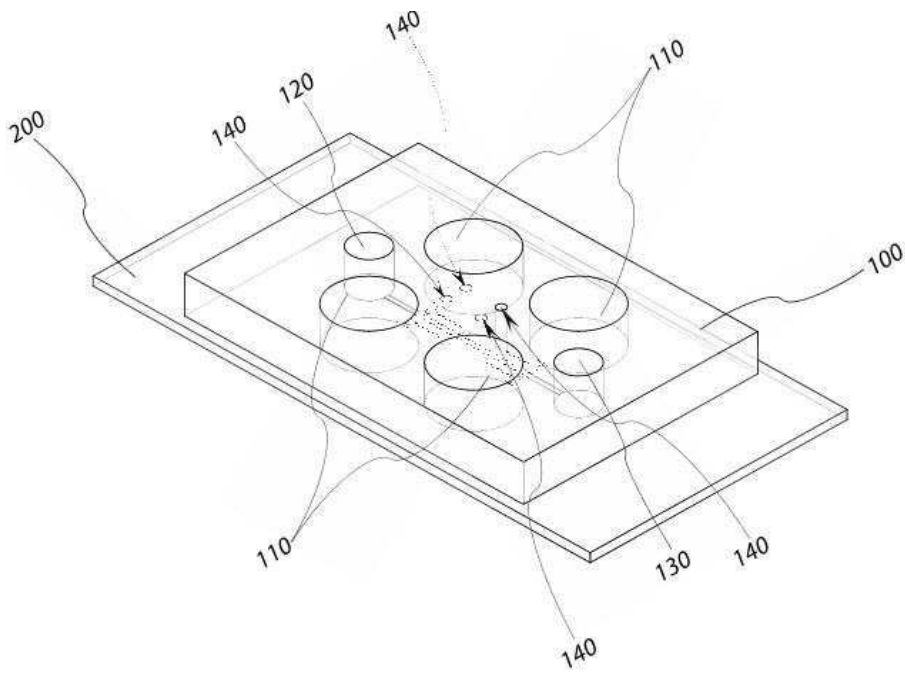
도면2



도면3

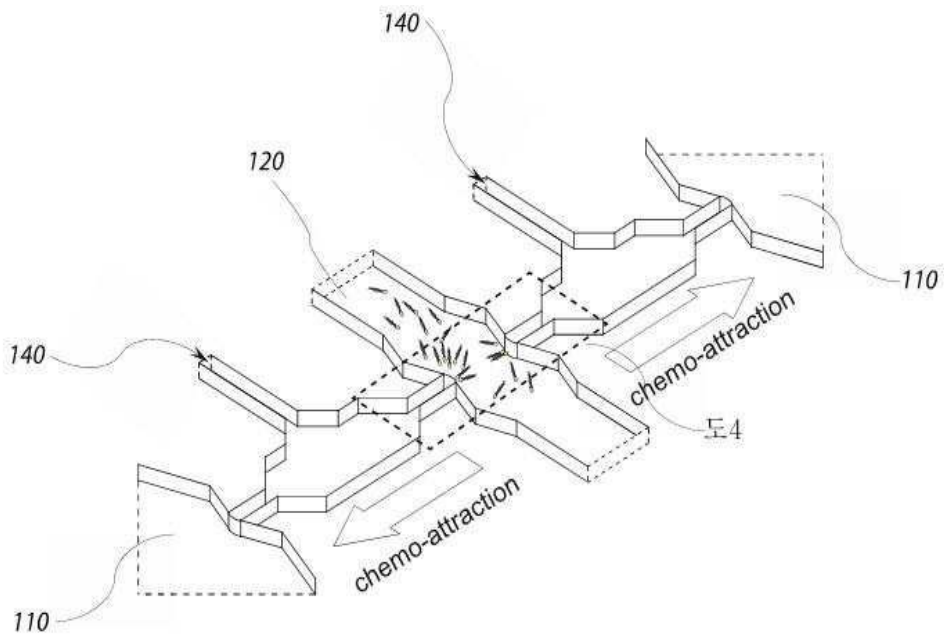


도면4

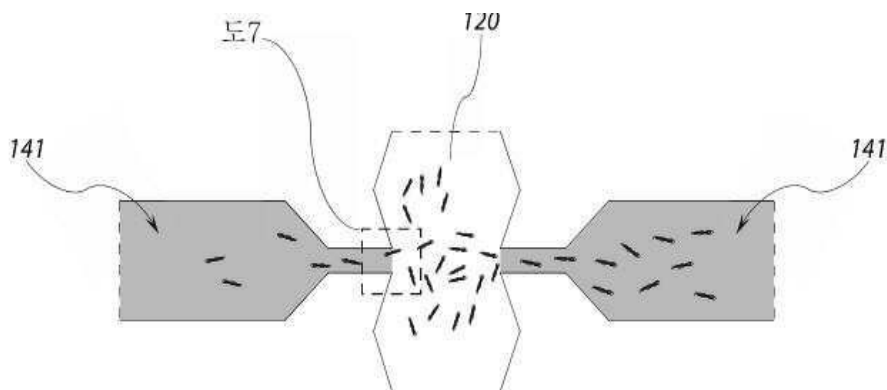




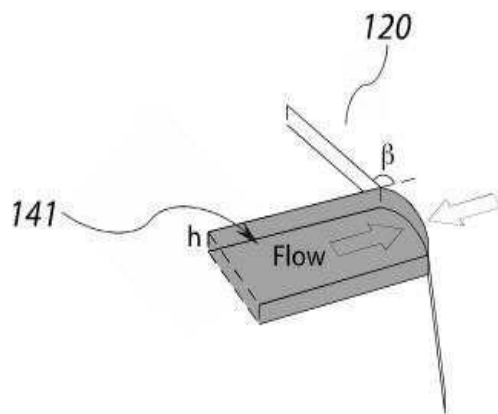
도면5



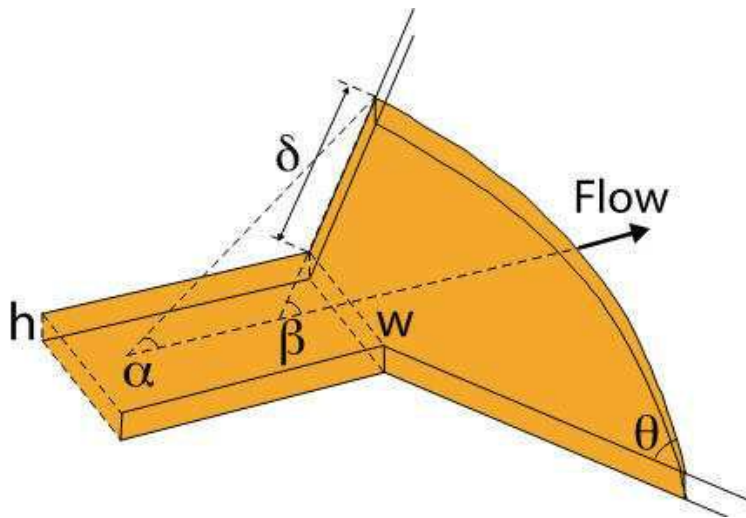
도면6



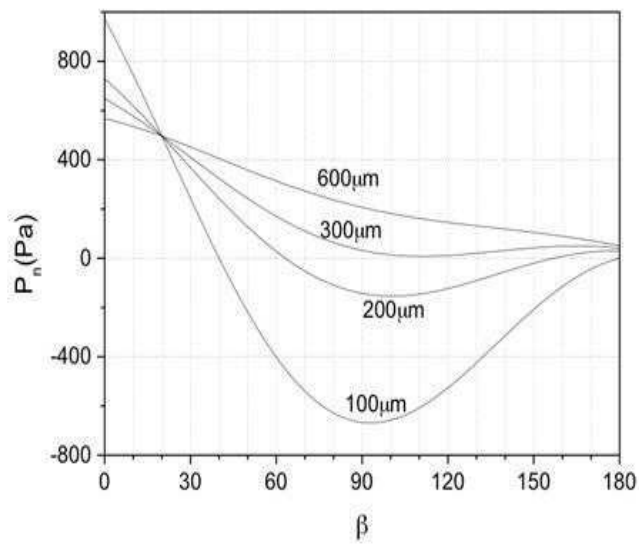
도면7



도면8a

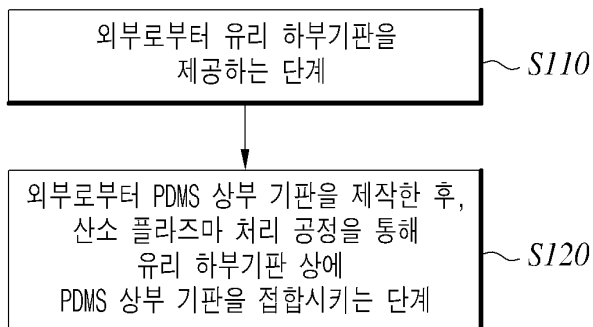


도면8b



도면9

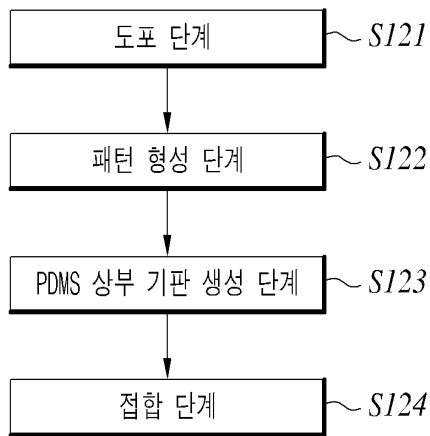
S100



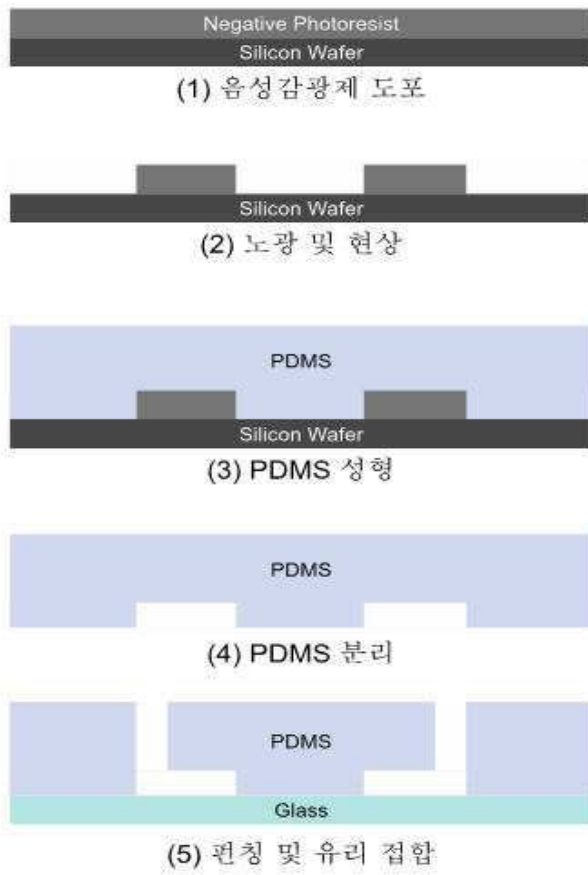


도면10

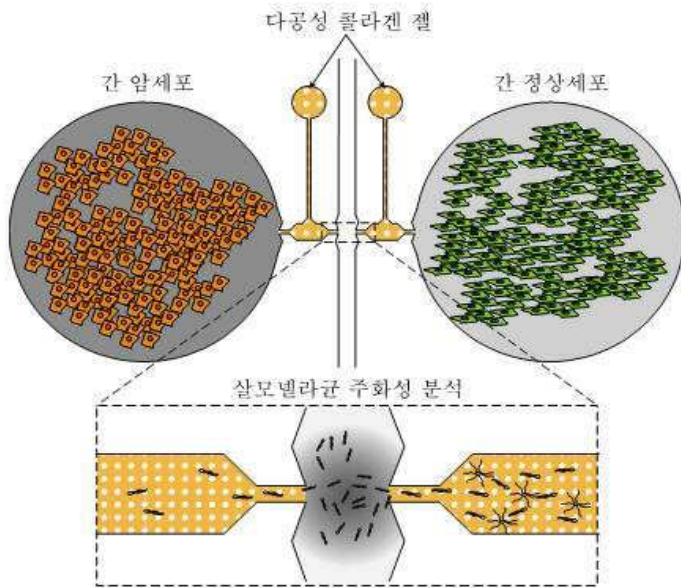
S120



도면11



도면12



도면13

