

공초점 주사현미경을 통한 미세 유로에서의 유동 가시화

장준근^{†**} · 박성진^{*} · 김종경^{**} · 한동철^{*}

Flow Visualization in Microchannel Using Confocal Scanning Microscope

Jun Keun Chang · Sung-Jin Park · Jung Kyung Kim and Dong Chul Han

Abstract. This paper presents the visualization method in which 3-dimensional(3D) microchannel flow can be detected using a confocal scanning microscope. By soft-lithography, we fabricated various Bio-MEMS(Micro Electro-Mechanical System) devices such as a disposable microchip for a flow cytometer and a micro-mixer, which have 3D structures. Injecting aqueous fluorescent solution in the microfluidic devices, we measured the flow in a steady state by the confocal scanning microscope. At first, we explain the principle of the confocal scanning microscope. And then we show the results from 3D visualization of microscopic flow structures using the confocal scanning microscope.

Key Words : Confocal Scanning Microscope(공초점 주사현미경), Flow Visualization(유동가시화), Microchannel Flow(미세유로 유동), Bio-MEMS(바이오 멤스)

1. 서 론

Soft-lithography의 개발과 이에 따른 발전은 Bio-MEMS 분야에 많은 변화를 가져왔다. 폴리머를 기본 재료로 사용하므로 실리콘을 사용하였던 기존의 microchip보다 원가가 절감되었고 일회용 chip의 제작이 가능해졌다. 또한 다층 구조를 가지는 chip 디자인을 현실화할 수 있어 3차원적인 시스템을 구현할 수도 있게 되었다.

Bio-MEMS 분야에서 개발되는 미세채널 형상이 점점 더 복잡해짐에 따라 3차원 유동 구조의 가시화 방법이 요구되고 있다. 특히, 단일 세포와 분자단위의 작은 입자들을 제어하려면 정확한 3차원 유로 형상과 유동 구조를 파악하는 기법이 필요한데, 공초점 주사현미경은 그 중 하나의 방법이다. 상용화된 일반적인 공초점 주사현미경으로는 주사 속도의 한계 때문에 정상상태의 유동에서만 측정이 가능하다는 제한점이 있지만, 과거부터 생물학 분야에서 오랫동안 사용되

어온 기법이므로 안정화된 가장 손쉬운 방법이라 하겠다. 특히 최근 컴퓨터의 성능이 향상되어 보다 정밀한 영상을 얻을 수 있게 되었다.

Hitt와 Lowe⁽¹⁾는 3차원적인 유로를 상용화된 공초점 주사현미경으로 관찰하였고 그 중 빛이 유체 내에서 굴절되는 효과를 고려하여, 즉 stretch factor를 고려하여 보다 정확한 3차원 형상을 얻어내었다. 이들 외에도 여러 연구자들이 micro-mixer chip에서 섞이는 유체를 공초점 주사현미경을 통하여 관찰하였는데, 특히 Havard 대학의 Whitesides 연구팀⁽²⁾은 다른 점도를 가진 서로 섞이지 않는 두 유체가 확산되어가는 단면의 형상을 공초점 주사현미경을 통하여 얻어내었고, 이를 바탕으로 섞이는 정도를 정량화할 수 있었다.

본 논문에서는 microfluidic system에서 여러 다른 3차원적인 유로 형상을 가진 microchip에 대해 공초점 주사현미경을 통하여 유로 형상과 단면 유동 형태를 얻는 방법에 관해 논의하고자 한다. 이를 위해 간단한 공초점 주사현미경의 원리와 적절한 형상을 얻기 위한 조건들을 소개하고, 유세포 분석기용 micro-chip과 미세구조물에서의 유체 혼합을 위한 micro-mixer에 대하여 공초점 주사현미경을 적용해 얻은 유동 형태를 비교한다.

*서울대학교 기계항공공학부
**㈜디지털바이오테크놀로지
†서울대학교 전기컴퓨터공학부
E-mail : jkchang@snu.ac.kr

2. Microfluidic Device

2.1 유세포 분석기용 microchip

유세포 분석기(flow cytometry)는 미세 입자가 포함된 샘플용액의 흐름을 sheath flow로 둘러싸이게 하여 흐름의 폭을 세포와 같은 미세 입자들이 한 개씩 줄지어 지나갈 정도로 작게 만들고(hydrodynamic focusing), 이때 흘러가는 미세 입자들을 광학적으로 검출하여 입자의 특성을 분석하는 장치이다. 최근 유세포 분석기의 유체부를 작은 일회용 chip으로 만드는 노력들이 진행되고 있는데⁽³⁾, microchip에서는 3차원 형상을 쉽게 만들 수 없는 반도체 공정의 한계 때문에 일반 상용화된 유세포 분석기처럼 3차원적인 hydrodynamic focusing이 아닌 2차원적인 hydrodynamic focusing을 사용하고 있다. 하지만 2차원적인 hydrodynamic focusing 방법은 유세포 분석기의 검출 성능을 떨어뜨리기 때문에 Fig. 1과 같은 준 3차원적인 focusing 방법이 필요하게 되었다.⁽⁴⁾ 이러한 3차원 focusing chip의 유동 특성을 평가하려면 입자들이 지나가는 유로를 3차원 영상으로 얻어야 하므로, 공초점 주사현미경이 가장 적절한 방법이라 하겠다.

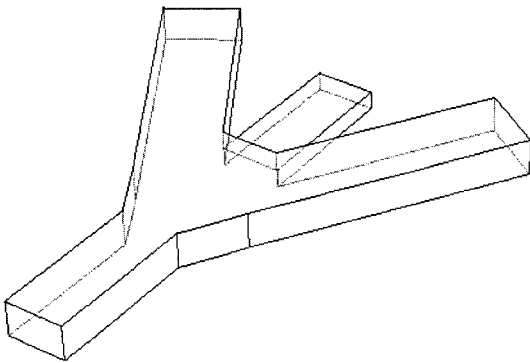


Fig. 1. Schematic of 3-dimensional hydrodynamic focusing chip for flow cytometry.

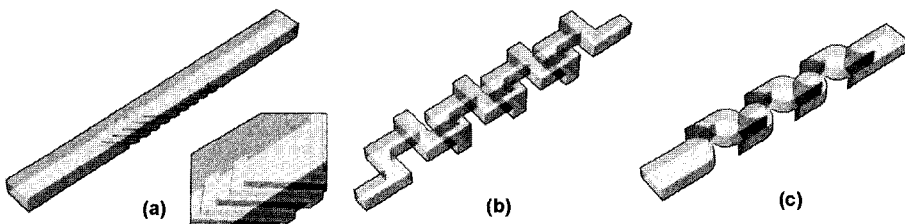


Fig. 2. Schematics of microfluidic micro-mixers. (a) micro-mixer using bas-relief structure, (b) and (c) micro-mixers using three-dimensional structures.

2.2 Micro-mixer

극히 작은 레이놀즈 수를 갖는 흐름인 Stokes 유동 ($Re < 1$)에서나 천이되는 영역 이전 ($Re < 400$)까지는 관성보다는 점성이 유체에 많은 영향을 미치게 되며, 이는 대부분의 microfluidic system에서 나타나는 현상이다. 이와 같은 일반적인 층류 영역에서 유체의 혼합은 대류보다는 주로 확산에 의해 영향을 받는다. 따라서, 혼합을 증대시키려면 강제적으로 대류 유동을 유도하여야 한다.

대류를 시키기 위해 강제적으로 횡방향 유동 (transverse flow)을 만드는데, 주로 적절한 유로 형상 설계를 통해 강제적으로 회전을 가하는 것이 최근의 경향이다.^(2,5,6) 회전하는 흐름을 발생시키고자 Fig. 2에 나타난 바와 같이 bas-relief 구조^(2,5), 3차원 구조^(6,7,8) 등의 여러 가지 형상이 개발되었는데, 이러한 구조물의 설계를 최적화하려면 섞이는 정도를 정량화하는 작업이 필요하다.

3. 공초점 주사현미경

공초점 주사현미경은 정확하게 초점이 맞는 빛만을 영상화하는 현미경이다. Fig. 3에 그 원리를 간단하게 도시하였다. CCD 카메라 또는 다른 신호검출센서 앞에 detector pinhole이 있어 대물렌즈를 통해 들어오는 빛 중에서 정확하게 초점이 맞는 빛만을 걸러낸다. 따라서 빛을 초점 평면(focal plane)을 따라 3차원적으로 제어하면 3차원 구조물의 형상을 얻을 수 있게 된다.

3.1 Pinhole의 크기

공초점 주사현미경에서는 pinhole의 역할이 중요하게 된다.⁽³⁾ Pinhole의 크기가 작을수록 초점이 맞지 않은 빛을 제거하여 보다 정확한 형상 정보를 얻어낼 수 있지만, 검출되는 빛의 세기는 급격히 감소하게 된

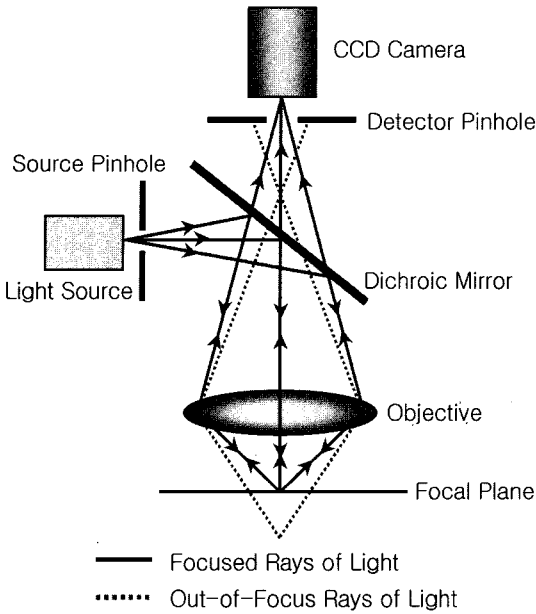


Fig. 3. Effect of pinhole in confocal scanning microscope.

다. 따라서 최적화된 pinhole의 크기가 존재하는데, 초점 평면의 두께를 최대한 줄이면서 검출 가능한 빛의 세기가 들어올 수 있도록 pinhole의 크기를 최적

화하는 일이 매우 중요하다. 이 경우 강한 레이저 빛을 이용할 필요가 있으나, 지나치게 강한 레이저 광선은 생체 시료의 손상이나 급격한 소광(quenching) 현상을 유발할 수 있으므로 주의를 기울여야 한다.

3.2 Stretch factor

Microchip과 같은 미세 구조물 내에서는 빛의 굴절 때문에 실제 현미경의 초점 위치 변화와 실제 빛의 초점 위치 변화가 다르게 되는데⁽¹⁾, 이 차이를 나타내는 계수를 stretch factor라 한다. Fig. 4는 측정하고자 하는 사각 채널에서 stretch factor가 발생하는 이유를 도식적으로 보여주는 그림이다. 굴절에 의해 발생하는 stretch factor는 실제 채널의 두께보다 측정된 값이 작게 나타나게 한다. 또한, marginal ray와 paraxial ray의 굴절되는 정도가 서로 달라 빛이 번지는 현상이 나타난다. 번짐 현상으로 인해 공초점을 조절하는 과정에서 부정확한 정보가 얻어질 수 있다. 이와 같은 이유에서 최적화된 slice thickness가 존재하게 된다.

이때, 대물렌즈의 built-in cover slip correction의 값이 중요하게 되는데, 보통 170 μm 정도의 값으로 설정되어 있다. 따라서 가장 안정화된 데이터를 얻으

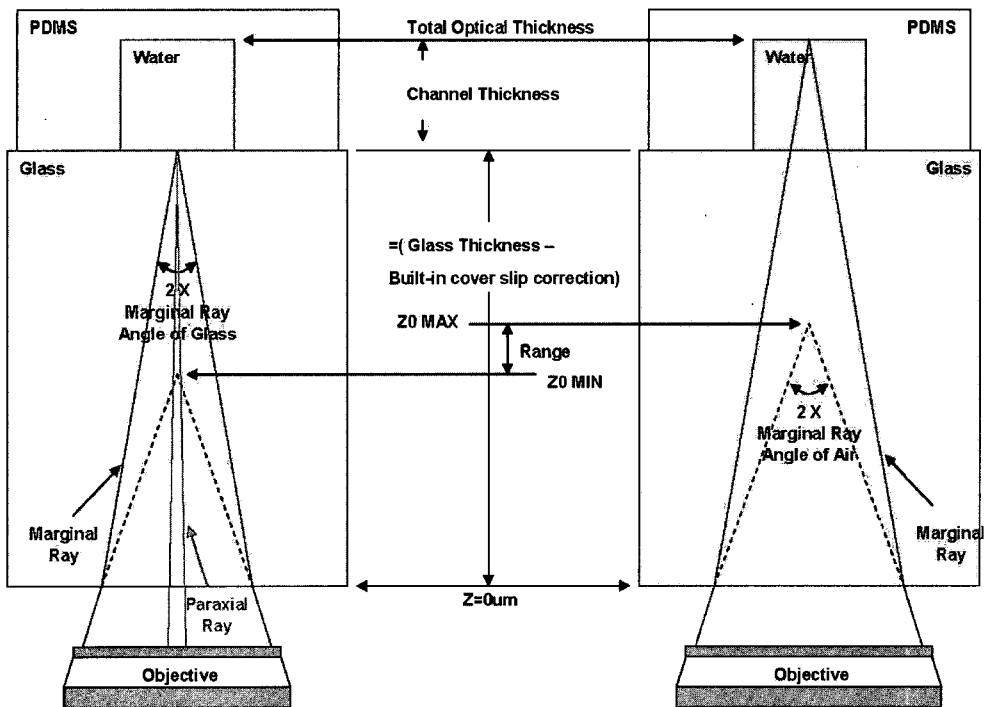


Fig. 4. Stretch factor in the confocal scanning microscope. The stretch factor is the ratio between the range in which the confocal scanning microscope actually moves and the channel thickness in which the light actually transmits when the confocal scanning moves.

려면 일반적인 cover glass 두께(170 μm)의 유리판을 하판으로 쓰는 것이 적절하다.⁽⁴⁾

이 밖에도 정확한 3차원 영상을 얻기 위해 고려해야 할 사항들이 있다. 특히, 형광물질과 같이 빛에 쉽게 반응하는 물질은 번짐 효과가 심하게 일어날 수 있다. 이를 제거하기 위하여 레이저의 출력을 낮추고 상대적으로 검출기의 gain값을 올려야 한다.⁽⁴⁾ 특히, 시료가 확산되어 번지는 효과까지 정확히 측정하려면 빛으로 인해 번지는 효과를 최대한 줄여줘야 한다. 이러한 확산 효과를 감소시키고자 작은 형광 입자를 이용할 수도 있다.

4. 3차원 유로 영상

4.1 유세포 분석기용 microchip

Fig. 5는 상용 공초점 주사현미경을 통해서 얻은 3차원 유동 구조를 보여 준다. 2차원 hydrodynamic focusing chip과 3차원 hydrodynamic focusing chip의 focusing 유동 형태를 비교할 수 있다. 특히, focusing이 되는 유로에서는 의도했던 3차원 focusing이 이루어지는 것을 확인할 수 있다.

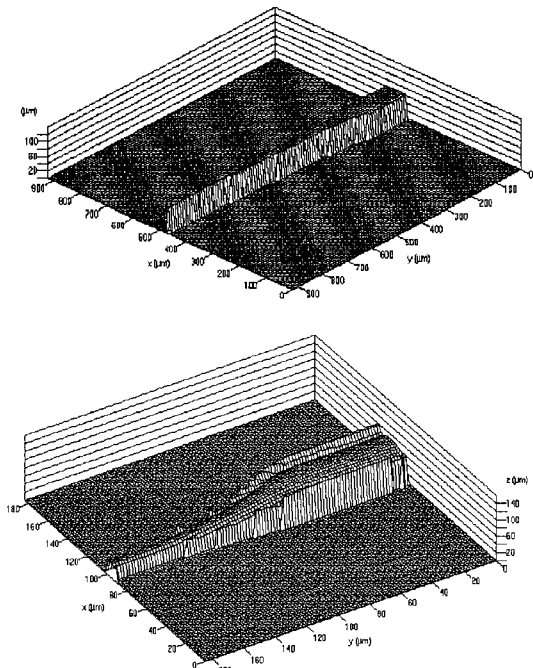


Fig. 5. Three-dimensional images of the flow structures obtained by the confocal scanning microscope. (Top) 2-dimensional hydrodynamic focusing. (Bottom) 3-dimensional hydrodynamic focusing.

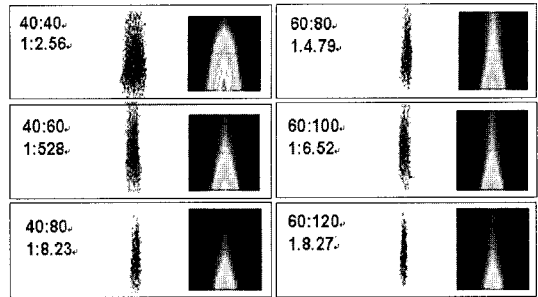


Fig. 6. Sectional images of flows in three-dimensional hydrodynamic focusing chip.

Fig. 6은 버퍼 유로의 폭과 샘플 유로의 폭을 변화시키면서 3차원 focusing 유동의 단면을 비교한 그림이다. 상용 CFD(computational fluid dynamics)를 통하여 얻은 데이터를 함께 나타내었다.

이를 보면, 샘플 유동의 하단부인 벽 부분에서 빛이 확산되는 현상보다는 샘플이 버퍼 용액에 의해 확산되는 효과가 더 크다는 것을 확인할 수 있었다. Hitt와 Lowe⁽¹⁾는 벽 부분에서 빛이 확산되는 현상을 Sobel 경계검출법으로 상쇄시킬 수 있었다. Sobel 경계검출법은 강도 분포 구배 중 가장 급격히 변화하는 지점을 벽의 위치라고 설정하는 방법이다. 하지만, 실제 버퍼 용액에 의해 샘플이 확산되는 효과는 같은 방법으로 제거할 수 없었다. 샘플이 확산되는 효과가 실제 빛으로 인해 급격히 변화하는 현상을 약화시키기 때문이다.

유세포 분석기에서는 미세 입자의 궤적이 중요하기 때문에, Park 등⁽⁴⁾은 이러한 빛의 확산 효과를 줄이고자 형광 입자를 이용하였다.

4.2 Micro-mixer

Fig. 7은 공초점 주사현미경을 통해 얻은 micro-mixer의 유동 단면 형상과 CFD로 얻은 결과를 보여 준다. 공초점 주사현미경을 통해 얻은 micro-mixer에서의 유동 형태와 CFD 계산 결과는 조금 차이가 있다는 것을 알 수 있다. 이는 micro-mixer 제작공정에서 상판과 하판이 완벽히 정렬되지 못해서, 실제 공초점 주사현미경을 통한 실험 결과에서는 CFD 결과보다 대류가 많이 발생했기 때문이라고 볼 수 있다.

Fig. 8은 micro-mixer를 연속적으로 배열했을 때 섞이는 현상을 보여준다. 레이놀즈 수가 높은 유동에서는 세번째에서 네번째 micro-mixer을 지나면서 완전히 섞이는 것을 확인할 수 있다. 이는 유로 시작점에서부터 600~800 μm 떨어진 지점이며, 기존의 연구^(2,6,7)에서

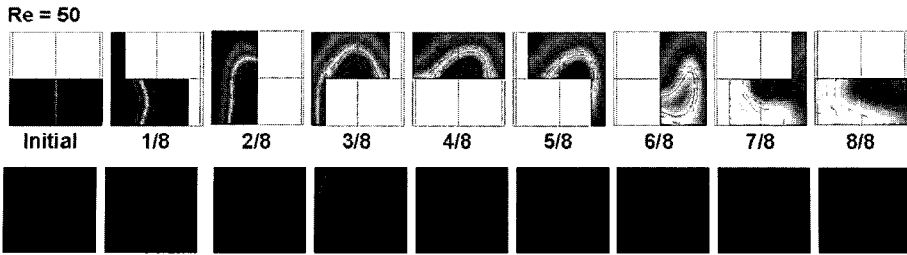


Fig. 7. Sectional images of a segment in micro-mixer obtained by the confocal scanning microscope. CFD results are shown at the upper row for comparison ($Re=50$)

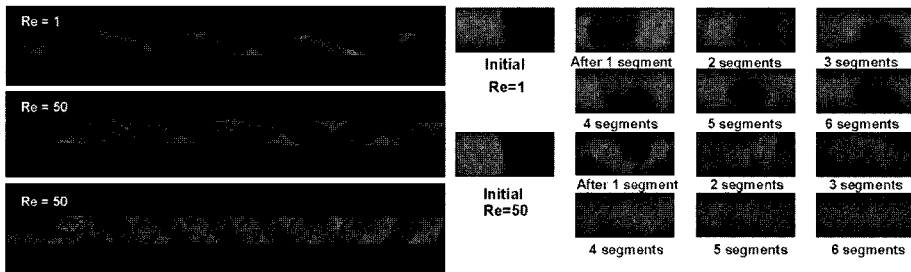


Fig. 8. (Left) Confocal images of flows in micro-mixer. (Right) Confocal images of mixing flows in the series of micro-mixers. Complete mixing occurs after 3 or 4 segments of the series of micro-mixers at $Re=50$

얻은 결과보다 2배 이상 짧은 거리로서 그만큼 혼합이 빨리 일어난다는 것을 의미한다. 이러한 현상이 나타나는 이유는 최적화된 형상 설계를 통해 강제적인 원형 와류를 만들었기 때문이라고 할 수 있다.

레이놀즈 수가 낮은 유동에서는 높은 유동보다 섞이는 효과가 작은 것을 관찰할 수 있는데, 이는 높은 레이놀즈 수 유동은 Stokes 유동과 달리 관성에 의한 효과도 무시될 수 없기 때문이다. 특히 낮은 레이놀즈 수 유동에서 하나의 micro-mixer를 통과하는 특정 시간(specific time)이 높은 레이놀즈 수 유동에서의 특정 시간보다 상당히 길기 때문에 강제적인 mixer 형상은 그만큼의 효과를 나타내지 못하였다.⁽⁸⁾

공초점 주사현미경으로 측정한 micro-mixer 영상은 hydrodynamic focusing chip 영상보다는 상대적으로 뚜렷하였다. 이는 수십 μm 크기의 focusing chip에 비해 micro-mixer는 수백 μm 크기를 갖는 넓은 형상이므로 좀더 작은 지름의 pinhole을 사용해 측정할 수 있었기 때문이다.

5. 결 론

공초점 주사현미경을 통해 미세 구조물 내부의 3차원 유동 구조를 측정할 수 있었다. 수십에서 수백 μm 크기

의 microchip에서 얻은 측정 결과는 CFD를 통해 얻은 결과와 유사한 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

공초점 주사현미경의 pinhole 크기나 stretch factor 등, 측정할 때 신중하게 고려해야 할 사항들을 소개하였고 각각의 영향을 고려하여 보다 정확한 측정을 할 수 있었다. 특히 pinhole의 크기는 빛이 확산되는 효과를 상당히 줄일 수 있는 중요한 요소임을 알 수 있었다.

최근 점점 복잡해지는 microfluidic system의 개발 과정에서 공초점 주사현미경은 3차원 미세 구조물 내부의 유체 유동을 측정할 수 있는 간편하고 안정된 도구이다. 하지만, 아직까지는 정상 상태의 유동 조건에서만 측정이 가능하다는 한계가 있다. 최근에는 이러한 제약을 극복하기 위하여 공초점 주사현미경의 주사 속도를 증가시키려는 노력이 다각도로 진행되고 있다.

참고문헌

- 1) Hitt, D.L. and Lowe, M.L., 1999, "Confocal Imaging of Flows in Artificial Venular" J. Biomech. Eng., Vol.121(4), pp.170~177.
- 2) Stroock, A.D., Dertinger, S.K. W., Ajdari, A., Mezic, I., Stone, H. A. and Whitesides, G. M., 2002,

- “Chaotic Mixer for Microchannels,” *Science*, Vol. 295, pp.647~651.
- 3) Kim, J.K., Bang, H., Lee, Y., Chung, C., Yoo, J.Y., Yang, S.S., Kim, J.S., Park, S. and Chang, J.K., 2001, “Micro-imaging Techniques for Evaluation of Plastic Microfluidic Chip,” *J. Semiconductor Tech. and Sci.* Vol.1(1), pp.1~16.
- 4) Park, S.J., Chung, S., Kim, J.K., Chung, C., Han, D. C. and Chang, J.K., Unpublished, “Three Di-mensional Hydrodynamic Focusing in Disposable Flow Cytometry.”
- 5) Johnson, T.J., Ross, D. and Locascio, L.E., 2002, “Rapid Microfluidic Mixing,” *Anal. Chem.*, Vol.74, pp.45~51.
- 6) Liu, R.H., Stremmer, M.A., Sharp, K.V., Olsen, M. G., Santiago, J.G., Adrian, R.J., Aref, H. and Beebe, D.J., 2000, “Passive Mixing in a Three Dimensional Serpentine Microchannel,” *J. MEMS*, Vol.9(2), pp. 190~197.
- 7) Beebe, D.J., Adrian, R.J., Olsen, M.G., Stremmer, M. A., Aref, H. and Jo, B.H., 2001, “Passive Mixing in Microchannels,” *Mec. Ind.*, Vol.2, pp.343~348.
- 8) Park, S.J., Kim, J.K., Han, D.C., Chang, J.K., Unpublished, “Rapid Three Dimensional Micro-Mixer Inducing Helical Rotational Flow.”