

마이크로 혼합기와 반응기로 구성된 DNA 결찰용 바이오칩에 관한 연구

강도형*, 안유민†, 황승용**

(2007년 10월 2일 접수, 2008년 7월 7일 수정, 2008년 7월 9일 심사완료)

A Study About Biochip Combined with Micro Mixer and Reactor for DNA Ligation

Do-Hyoung Kang, Yoomin Ahn and Seung Yong Hwang

Key Words : Microbiochip(마이크로바이오칩), Micromixer(마이크로혼합기), PVP Coating(PVP 표면처리), DNA Ligation(DNA 결찰)

Abstract

In this research, we developed new PDMS-glass based microbiochip consisted of the micromixer and microreactor for DNA ligation. The micromixer was composed of a straight channel integrated with nozzles and pillars, and the microreactor was composed of a serpentine channel. We coated the PDMS chip surface with the 0.25wt.% PVP solution to prevent the bubble generation which was caused by the hydrophobicity of the PDMS. The new micromixer was passive type and the mixing was enhanced by a convective diffusion using the nozzle and pillar. The 10.33mm long micromixer showed the good mixing efficiency of 87.7% at 500 l/min flow rate. We could perform the DNA ligation successfully in the microbiochip, and the ligation time was shortened from 4 hours in conventional laboratory method to 5 min in the microbiochip.

1. 서 론

최근 생화학(biochemistry)과 생명공학(biomedical engineering) 분야에 멤스(MEMS, Micro Electro Mechanical System) 기술이 적용되어 화학이나 생물학, 의학, 약학 등에서 활용될 수 있는 초소형시스템인 랩온어칩(Lab-on-a-Chip)과 마이크로 총분석 시스템(μ -TAS, Micro Total Analysis System)과 같은 마이크로(micro) 바이오칩(bio-chip) 시스템 연구가 활발히 진행되고 있다. 이와 같은 시스템은 생화학 시료의 처리, 반응, 검출, 분리 등을 하나의 칩 상에서 수행할 수 있기 때문에 적은 시료의 양과 저렴한 비용으로 실험이 가능하고 실험 시간도

단축할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 장점 때문에, 마이크로 바이오칩 시스템은 특정 단백질 검출, DNA(deoxyribonucleic acid) 분석, 세포 배양 등 다양한 목적의 연구에 적용되고 있다. 특히, DNA는 생물학적 유전정보를 담고 있어서 이를 이용하여 유전병과 같은 질병 유무 등을 판별하는데 활용된다. 또한 유전공학 측면에서는 DNA 재조합을 통해 특정 질병에 견딜 수 있는 내성 동물이나 식물 등을 개발하고 있다. 이렇듯 적용 가능성이 많기 때문에 DNA를 조작하거나 분석하는 바이오칩들이 연구되고 있다.^(1~3)

DNA 재조합은 먼저 제한효소(restriction enzyme)에 의해 DNA를 단편으로 자르면, 다른 곳에서 얻은 DNA 단편을 첨가하고, DNA 연결효소(ligase)로 그들 단편들을 서로 붙여 새롭게 조합된 유전자를 지닌 DNA를 얻는 과정으로 이루어진다. DNA 결찰(ligation)은 DNA 재조합의 필수적 요소로서 서로 다른 DNA 단편들을 하나로 이어 결합시키는 작용이다. 일반적으로 실험실에서 수행하는 DNA 결찰은 반응시간

* 한양대학교 대학원 기계공학과

† 책임저자, 회원, 한양대학교 기계공학과

E-mail : ahnym@hanyang.ac.kr

TEL : (031)400-5281 FAX : (031)406-5550

** 한양대학교 분자생명과학부

이 오래 걸리고 마이크로피펫(micropipette) 및 물중탕(water bath) 등의 사용으로 실험자의 많은 노동력이 요구되고 매우 지루한 작업이다. 그래서 이러한 문제점들을 개선시킬 수 있는, 즉 빠른 시간 내에 간단한 조작으로 DNA 결찰을 수행할 수 있는 바이오칩이 개발된다면 많은 도움이 될 것이다. DNA 결찰을 바이오칩에서 수행하기 위해서는 DNA 단편들과 연결효소들을 효과적으로 혼합시킬 수 있는 마이크로 혼합기(micromixer)가 필수적이다. 바이오칩에 사용되는 혼합기는 일반적으로 시료들이 마이크로채널 내로 흘러가면서 혼합이 되는 형태를 하고 있다.⁽⁴⁾ 하지만 마이크로 영역에서는 매크로(macro) 영역일 때와 달리 특성 길이와 유동속도가 작기 때문에 층류를 형성하여 혼합이 잘 이루어지지 않는다. 그리고 속도가 작은 영역에서는 주로 확산에 의해서만 이루어지기 때문에 혼합이 매우 느리게 진행된다. 그래서 이러한 문제점들을 개선하여 혼합효율을 높이기 위한 마이크로 혼합기에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. 이러한 마이크로 혼합기는 크게 능동형(active)과 수동형(passive)으로 나눌 수가 있다.⁽⁵⁾

능동형 마이크로 혼합기는^(6,7) 유체를 혼합시키기 위해 외부동력을 이용하여 혼합효율을 높인다. 하지만 이를 위해 유체를 혼합시키는데 필요한 자기장이나 전기장 등을 발생시키기 위한 구동부(actuator)가 필요하고 이러한 구동부의 제작과정은 매우 복잡하고 외부전원을 사용하기 때문에 다른 유체소자(fluidic component)들과 더불어 하나의 마이크로칩에 집적화시키는데 한계를 가지고 있다. 또한, 구동부에서 발생된 자기장이나 열이 생화학 반응에 영향을 미칠 수가 있다. 이에 비해 수동형 마이크로 혼합기는⁽⁸⁻¹⁰⁾ 능동형 마이크로 혼합기에 비해 제작공정이 단순하고 조작성이 용이하며, 외부전원을 사용하지 않는 장점이 있다. 특히, 이러한 수동형 마이크로 혼합기는 능동형과는 달리 마이크로칩으로 집적화 시키는데 매우 유리하기 때문에 현재 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 수동형 마이크로 혼합기는 확산이 일어나는 두 유체 사이의 경계면적을 증가시키기 위해 혼합경로를 늘리거나, 여러 개의 층을 사용하여 삼차원의 형태로도 만들어지고 있다.^(11,12) 하지만 이렇듯 복잡한 형상을 가질수록 제작과정이 길어지고 급변하게 변화되는 유로의 단면형상 때문에 기포가 발생할 수 있다는 문제점이 있다. 이렇게 생긴 기포는 생화학 반응의 활성도를 낮출 뿐만 아니라 원활한 유체 유동을 방해한다.

이러한 수동형 마이크로 혼합기의 단점을 보완하기 위해 채널 내에 마이크로 기둥(pillar)을 설치한 혼합기가 연구되기도 했는데,^(13,14) 본 연구에서는 마이크로 기둥과 마이크로 노즐(nozzle) 들이

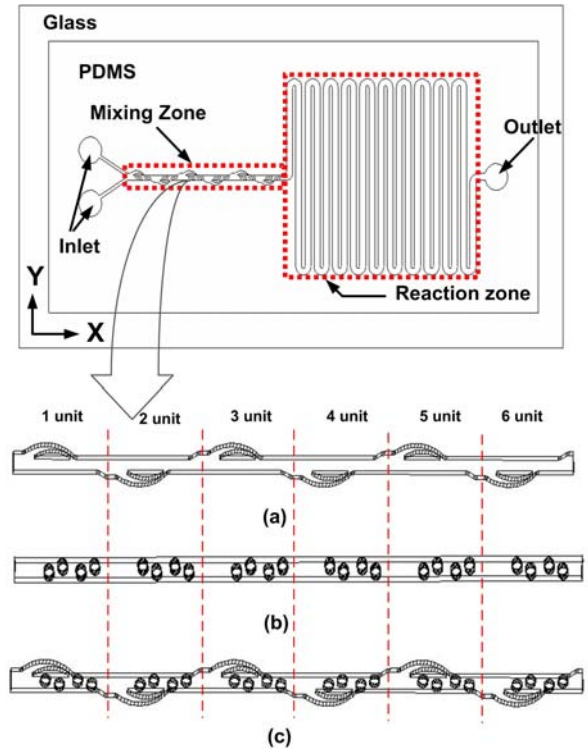


Fig. 1 Schematic of a microbiochip for ligation reaction; (a) nozzle type, (b) pillar type, (c) nozzle and pillar type. Dashed lines represent the section of mixing

조합된 간단한 형태의 수동형 마이크로 혼합기를 새로이 설계하고, 이를 채널 형태의 반응기(reactor)와 결합시킨 DNA 결찰용 PDMS (polydimethylsioxane)-유리 바이오칩을 개발하였다. 그리고 혼합기에 시료를 주입할 때 PDMS 표면의 소수성 때문에 기포가 발생하는 문제 해결을 위해 친수성 표면처리 방법을 사용하였다. 새롭게 제안된 수동형 마이크로 혼합기의 혼합성능을 비교 평가하기 위해 마이크로 노즐 혹은 마이크로 기둥으로만 구성된 수동형 마이크로 혼합기 들도 제작하였다. 혼합실험뿐만 아니라 수치 해석 시뮬레이션을 수행하여 세가지 형태의 마이크로 혼합기들의 혼합효율을 비교하였다. 최종적으로, 제작된 바이오칩으로 DNA 결찰 실험을 수행하여 반응유무와 반응시간 등을 살펴보아 개발된 바이오칩의 성능을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 바이오칩의 설계 및 제작

개발하고자 하는 바이오칩의 개략도는 Fig. 1 과 같다. 시료를 주입하는 주입구(inlet)와 주입된 시료가 혼합되는 혼합부(mixing zone), 혼합된 시료가

반응하는 반응부(reaction zone), 반응된 시료를 뽑는 유출구(outlet)로 이루어져 있다. 혼합부는 직선 채널에 마이크로 노즐과 마이크로 기둥이 형성된 구조로 되어 있고, 반응부는 사선형(serpentine) 채널 형태로 설계되었다. 사선형 채널 형태는 시료가 주입될 때에 기포가 발생되지 않기 때문에 반응부 형상으로 사용하였다.⁽³⁾ 세부적인 설계치수는 다음과 같다. 주입구와 배출구의 직경은 1.5 mm 이고, 혼합 부분 채널의 길이와 폭은 각각 10.33 mm, 300 μm 이다. 마이크로 기둥의 직경은 180 μm 이고 기둥 중심과 기둥 중심 간의 거리는 Fig. 1에서 X 축 방향으로 250 μm 이고 Y 축 방향으로 80 μm 이다. 마이크로 기둥 벽과 채널 벽 사이의 간격은 20 μm 이다. 마이크로 노즐의 입구와 출구의 폭은 각각 200 μm , 50 μm 이다. 그리고 반응부 채널의 폭은 400 μm 이고 총 길이는 약 20 mm 이다. 칩의 혼합부와 반응부의 채널 등의 모든 높이는 100 μm 로 동일하다.

본 연구에서 제안한 마이크로 혼합기[Fig. 1(c)]의 성능을 비교 평가하기 위해 노즐로만 이루어진 혼합기[Fig. 1(a)]와 기둥으로만 이루어진 혼합기[Fig. 1(b)]도 설계 및 제작하였다. 바이오칩들은 생화학적 안정성이 검증된 PDMS 와 유리기판을 주재료로 하여 제작하였다. 주입구, 유출구, 그리고 마이크로 혼합기와 반응기가 형성된 PDMS 층(layer)은 복사형틀법(replica molding)을 이용하여 제작하였다. 실리콘 기판(Silicon wafer)위에 음성후막감광제(negative photoresist, SU-8)를 100 μm 두께로 회전도포(spin coating)를 하였다. 도포된 감광제 속에 있는 용제(solvent)를 제거하기 위해 열처리를 한 후 사진공정법(photolithography)으로 혼합부와 반응부가 있는 형틀(mold)을 제작하였다. 제작된 형틀에 PDMS 와 경화제가 10:1 비율로 섞인 혼합물(mixture)을 붓고, 이를 오븐(oven)에서 65°C에서 4 시간 동안 경화시켰다. 경화된 PDMS 를 형틀에서 분리시키고 기계적인 천공(punching)으로 주입구와 유출구 구멍을 만들어 PDMS 층을 완성하였다. 완성된 PDMS 층을 유리기판과 산소 플라즈마(O_2 plasma) 표면처리로 접합을 하여 최종적인 바이오칩을 완성하였다. 제작된 DNA 결찰용 바이오칩은 Fig. 2 와 같다.

2.2 표면처리 실험

본 연구에서 사용된 PDMS 층 표면은 유리기판과의 접합을 위해 산소 플라즈마 표면처리를 하면 일정시간 동안은 친수성을 지니게 된다. 하지만 시간이 경과함에 따라 PDMS 의 본래 성질인 소수성으로 변하게 된다. 그래서 일정 시간(약 6 시간)

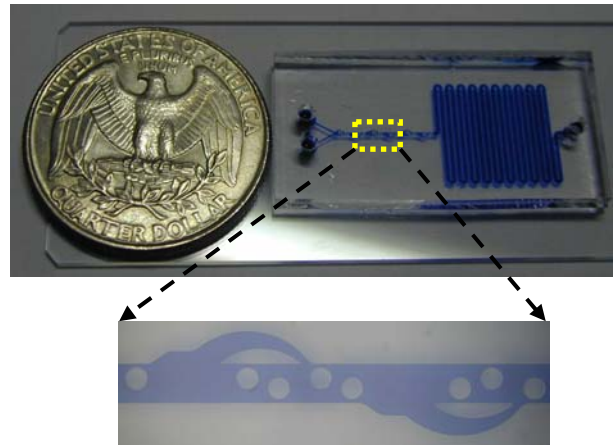


Fig. 2 Photograph of the fabricated microbiochip

이후에 생화학 시료를 주입하게 되면 소수성에 의해 PDMS 채널 내에 기포가 생겨나게 된다. 이 때에 생겨난 기포는 생화학 반응 활성도를 낮출 뿐만 아니라 유체유동을 방해하게 된다. 그래서 이러한 점을 해결하기 위해서 PVP(polyvinylpyrrolidone)와 탈이온수(deionized water)가 일정 비율로 혼합된 PVP 용액을 제작된 칩에 주입한 후 110°C 오븐에서 10 분 동안 표면처리를 하였다.

PVP 용액은 PDMS-유리로 제작된 중합효소연쇄반응(PCR; polymerase chain reaction)용 바이오칩에서 DNA 가 PDMS 벽면에 흡착하는 것을 방지하는 동적 피복제(dynamic coating)로 사용되고 있다.⁽¹⁵⁾ 본 연구에서는 PDMS 표면성질을 친수성으로 반영구적으로 바꾸어주는 피복제로 이용하였다. 먼저 일반 실험실에서 수행되는 방법으로 DNA 결찰을 PVP 용액을 첨가한 상태에서 수행해 보았는데, PVP 용액이 DNA 결찰에 영향을 끼치지 않음을 확인할 수가 있었다. PVP 용액에 포함되어 있는 PVP 농도에 변화 따른 표면처리 효과를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 실험방법으로 PDMS 층 표면에 여러 농도의 PVP 용액으로 표면처리 한 후에 소수성 및 친수성 정도를 알 수 있는 표면 접촉각을 접촉각 측정기(Phoenix 300, S.E.O, Korea)를 이용하여 측정하였다.

2.3 수치해석 시뮬레이션

제안된 마이크로 혼합기의 성능을 확인하기 위해 유한체적법(finite volume method)를 기반으로 하는 전산유체역학 상용 프로그램인 CFD-ACE+ (CFD Research Corporation, AI, USA)를 이용하였다. Fig. 1 (a), (b), (c)의 세 가지 형태의 마이크로 혼합기들에 대한 혼합현상을 시뮬레이션 해 보았다. 혼합 유체로는 물과 파란 잉크가 섞인 에탄올을 선택하였다.

두 유체를 비압축성 및 뉴턴 유체로 가정하였고, 20°C에서 정상 상태(steady state)의 유동으로 가정하였다. 20°C에서 물과 에탄올의 물성치는 Table 1 과 같다. 두 유체의 혼합 양상을 모사하기 위해서는 점성과 밀도차이에 의한 영향을 반영해야 하는 것이 바람직하다. 그러나 기체가 아닌 액체 상태에서의 서로 다른 두 유체가 혼합되는 경우에 대해서는 해석법이 아직 없다. 따라서 수치모사 대상의 주요 두 유체인 물과 에탄올의 점성과 밀도 차이가 크지 않으므로, 동일한 유체끼리의 혼합 상태로 가정하고 점성과 밀도의 물성치는 물과 에탄올의 물성치 평균값을 적용하였다. 유로 내 유체 흐름과 농도차이에 따른 확산을 해석하기 위하여 프로그램의 유동모듈(flow module)과 유저스칼라모듈(user scalar module)을 이용하여 시뮬레이션을 하였다.

마이크로 혼합기의 해석 영역은 복잡한 형상에 쉽게 적용할 수 있는 3 차원 비정렬 격자(3-dimensional unstructured grid)로 모델링하였으며, 각각의 총 절점수와 총 체적 요소 수는 Table 2 와 같다. 수치해석 기법으로 속도장 해석의 공간 차분에 대해서는 2 차 풍상 차분법(second order upwind scheme)을 적용하였고 계산법으로는 conjugate gradient squared and preconditioning (CGS+Pre)방법을 사용하였으며 압력장 계산법으로는 algebraic multigrid (AMG) 방법을 이용하였다. 경계조건으로 모든 혼합기에 대해서 두 주입구에서는 일정 속도(fixed velocity)로 가정하고 유출구에서는 고정 압력(fixed pressure)으로 가정하였다. 에탄올에 섞인 파란 잉크는 입구에서 계속 일정 농도로 유입되는 조건을 사용하였으며, 벽면에서는 안미끄러짐 조건(no-slip condition)을 적용하였다. 이러한 경계조건에 대한 정상유동 상태의 혼합 양상을

혼합기 영역 내의 각 구간별로 각각의 혼합기에 대해서 해석하였다.

2.4 혼합효율 평가실험

마이크로 혼합기의 혼합효율을 실제 실험을 통해 측정하였다. 작동 유체로는 수치모사에 적용된 혼합유체에 맞추어 탈이온수와 파란 잉크가 섞인 에탄올을 사용하였다. 시료 주입은 주사기 펌프(KDS200, kdScientific Inc., U.S.)를 이용하여 동시에 주입하였다. 주입 유량은 50, 100, 200, 300, 400, 500 l/min 등으로 하였다. 노즐형, 기둥형, 그리고 노즐 및 기둥 혼합형에 대해서 Fig. 1 의 1-6 구간 각각에 대해서 혼합효율을 구하였다. 실험은 각 유량조건에서 5 번씩 수행하여 평균값을 구하였다. 혼합효율은 혼합될 때의 영상을 측정하여 계산하였다. 이를 위해 광학현미경(OPTIPHOT300, Nikon Co., Japan)과 이와 연결된 디지털 카메라(COOLPIX950, Nikon Co., Japan)를 이용하여 혼합기 채널의 높이 방향으로 중간 지점에서의 혼합형태를 영상으로 얻었다. 얻어진 영상을 컴퓨터 영상 프로그램(Paint shop pro version 10, Jasc software, Inc.)을 사용하여 그레이스케일(gray scale)을 가지는 pgm(portable gray map) 파일로 변환시켰다. 이 때 변환된 pgm 파일 내 각 화소(pixel) 점은 명암도에 따라 0(검은색)과 255(흰색) 사이의 값을 가진다. 이렇게 변환된 pmg 파일 영상을 혼합기 채널의 폭 방향으로 일정한 간격을 가지는 50 개의 화소점으로 나누어 각 점에서의 명암값 I_i 를 구했다.

혼합이 일어나지 않은 탈이온수 만을 그리고 파란 잉크가 섞인 에탄올 만을 마이크로 혼합기에 주입하고 구한 명암값(I_i) 들을 각각 기준값 I_W 와 I_B 로 하였다. 각 화소 점에서 구한 명암값들을 식 (1)에 대입하여 0 과 1 사이의 값을 가지는 정규화 값 I_i^N 으로 바꾸었다.⁽¹⁶⁾

$$I_i^N = \frac{I_i - I_B}{I_W - I_B} \tag{1}$$

다음엔 정규화 값을 식 (2)에 대입하여 혼합효율 E 를 계산하였다.

$$E = \left(1 - \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (I_i^N - I_i^{N, per.mix})^2}}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (I_i^{N, unmix} - I_i^{N, per.mix})^2}}\right) \times 100(\%) \tag{2}$$

식 (2)에서 $n(=50)$ 은 화소 점의 개수이고 $I_i^{N, per.mix}$

Table 1 Properties of working fluid at 20°C

Fluid	Viscosity (Kg μ m ⁻¹ s ⁻¹)	Diffusivity (μ m ² s ⁻¹)	Density (Kg μ m ⁻³)
Water	9.0 \times 10 ⁻¹⁰	1.2 \times 10 ³	9.998 \times 10 ⁻¹⁶
Ethanol	1.2 \times 10 ⁻⁹	1.2 \times 10 ³	7.89 \times 10 ⁻¹⁶

Table 2 The number of total node and volume element for each micromixer

Type	Nozzle type	Pillar type	Nozzle and pillar type
Number of total node	124315	172305	145675
Number of total volume element	199072	260192	212148

는 탈이온수와 잉크 섞인 에탄올의 두 유체가 완전히 혼합되었을 때에 측정하여 구한 정규화 값이며 $I_i^{N, ummix}$ 는 두 유체가 혼합되기 전에 측정한 각 화소 점에서의 초기 명암도의 정규화 값이다.

2.5 DNA 결찰 실험

유용하게 사용할 재조합 DNA 를 대량으로 만들기 위해서는 먼저 관심 유전자를 지니는 DNA 와 벡터(vector) 역할을 할 박테리아의 플라스미드(plasmid) DNA 들을 같은 제한효소로 분리한다. 그리고 분리된 DNA 단편들을 DNA 연결효소로 서로 연결시켜 재조합 DNA 플라스미드를 만든다. 형질전환(transformation)에 의해 재조합 플라스미드를 자기증식이 가능한 세포에 넣는다. 재조합 플라스미드를 지닌 세포가 복제하여 많은 클론(clone)을 형성하면 재조합 플라스미드가 지닌 유전자 또한 클론을 형성하게 된다.⁽¹⁷⁾ 이렇게 클로닝(cloning)된 DNA 단편은 제한효소로 플라스미드 DNA 로부터 절단한 후 전기영동법으로 분리하여 회수될 수 있다. 이러한 DNA 클로닝(cloning) 실험을 위해서, DNA 연결효소는 DNA Ligation Kit Version 1.2 (Takara, Japan)의 것을 그리고 제한효소는 Hind III (Roche, Switzerland)를, 플라스미드 벡터로는 T&A Cloning Vector (Real Biotech Corporation, Taiwan)을, 벡터에 삽입(insert)될 관심 DNA 인서트(insert)로서는 HV1 을, 자기 증식과 복제를 할 수 있는 숙주 세포로서는 Competent Cell (Rea Biotech Corporation, Taiwan)을, 그밖에 DNA 결찰을 위한 연결효소 완충액 (ligase buffer; Invitrogen, U.S.)을 사용하였다. T&A 벡터의 길이는 2728 bp(basepair) 이다. HV1 DNA 단편은 미토콘드리아 DNA 내에 있는 개인마다 서열들이 다른 초변이 영역(Hypervariable region) 중에 존재하며 길이는 약 440bp 이다. 미토콘드리아 DNA 는 핵 DNA 보다 세포 1 개 내에 들어있는 수가 1000 ~ 3000 배가 많고 외부환경 조건에 대해 핵 DNA 보다 비교적 안정하기 때문에 법의학에서는 개인 판별을 위해 이용되고 있다.

제작된 바이오칩으로 DNA 결찰 실험을 수행하기 앞서, 제한효소로 단편으로 잘린 플라스미드와 HV1 을 준비하였다. 제작된 바이오칩에는 우선 10 μ l 연결효소 완충액을 채워 넣었다. 그 다음에 칩의 두 주입구 중 한 쪽에는 4 μ l 연결효소와 4 μ l HV1 가, 다른 한 쪽에는 4 μ l 연결효소와 3 μ l 플라스미드 그리고 1 μ l 탈이온수 들이 들어있는 마이크로피펫 팁(tip) 들을 각각 꽂아놓은 상태에서 처음에 채워 넣던 완충액을 마이크로피펫(micropipette)을 이용하여 유출구로 뽑아내었다. 이 때 칩에서 완충액을 추출하게 되면 마이크로피펫의 흡입력에 의해서 마이크로피펫 팁들에 있던 시료들이 칩의 혼합부로 유입되면서 혼합이 이루어지

고 칩의 반응부까지 채우게 된다. 혼합부에서 혼합된 시료가 반응부 채널에 채워진 상태에서 칩을 1~5 분 동안 실온에 나누어 DNA 결찰을 시켰다. 최종적으로 DNA 결찰 결과물을 마이크로피펫으로 유출구로부터 뽑아내었다.

DNA 결찰이 제대로 이루어졌는지를 확인하기 위해 칩에서 뽑아낸 결과물을 형질전환으로 자기증식 세포에 유입시켰다. 그리고 세포를 한천평판(agar plate)에 펼친 후 12 시간 이상 배양하였다. 배양된 세포들 중에서 재조합 플라스미드가 들어있는 세포 군체는 흰색을 띄고, 재조합이 안된 플라스미드가 들어있는 세포 군체는 파란색(blue)을 띄게 된다. 따라서 흰색 군체(white colony)만을 선택하였으며, 더 많은 흰색 군체를 얻기 위해 LB(Luria-Bertani) 배지에 배양을 시켰다. 그런 후 세포에서 플라스미드 DNA 를

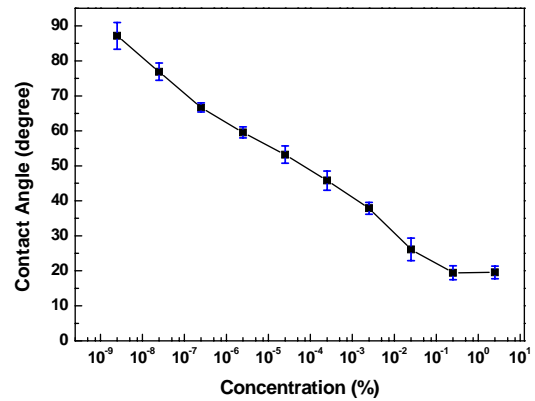


Fig. 3 Change of measured contact angle according to the concentrations of PVP in D.I water solution

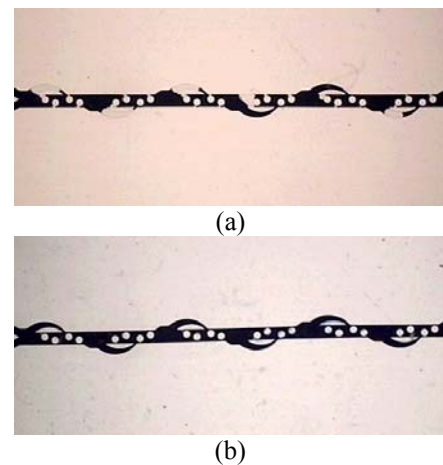


Fig. 4 Result of surface treatment when water blended with black ink injected to (a) uncoated mixer and (b) PVP coated mixer

정제된 다음에 Hind III 제한효소로 정제된 DNA를 잘랐다. 마지막으로 잘린 DNA 단편들을 젤 전기영동 (gel electrophoresis)으로 크기 별로 분리하여 바이오칩 내에서 HV1 유전자가 플라스미드 벡터에 제대로 삽입되어 DNA 결찰이 되었는지를 확인하였다.

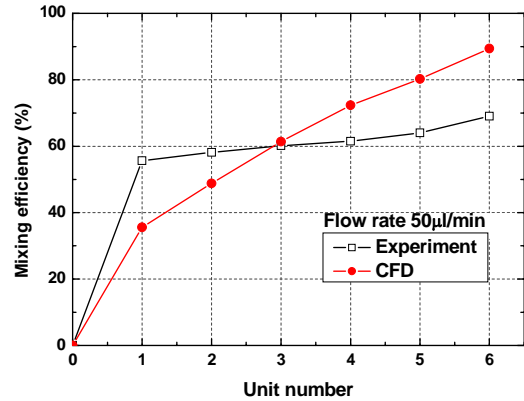
3. 실험결과

3.1 PDMS 친수성 표면처리

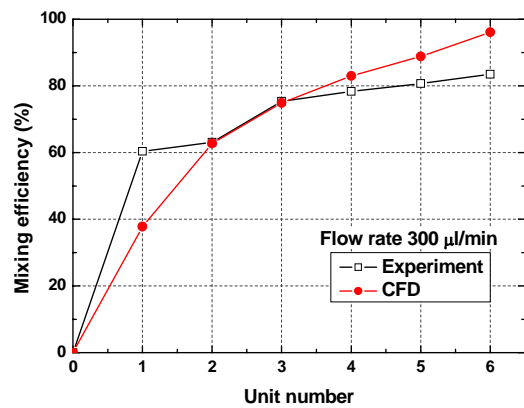
Fig. 3은 $2.5 \times 10^{-9} \sim 2.5$ wt. % 농도를 가지는 PVP 용액으로 PDMS 칩을 표면처리한 후에 접촉각을 측정한 결과이다. 친수성이 강할수록 접촉각이 작아지는데, 측정한 결과는 PVP 농도가 높을수록 PDMS 표면의 접촉각이 작게 나타났다. 이는 PDMS 표면과 결합하는 PVP의 양이 늘어날수록 PDMS 본연의 성질인 소수성이 친수성으로 변화되기 때문이다. PVP 농도가 0.25 wt. % 이상에서는 접촉각이 약 20° 보다 더 이상 작아지지 않고 거의 일정하다. 따라서 PVP 용액으로 PDMS 표면을 친수성으로 최대한 변환시킬 수 있는 최소한의 농도는 0.25 wt. %이다. 이러한 0.25wt.%의 PVP로 PDMS를 표면처리 하고, 표면처리 후에 시간이 경과됨에 따른 접촉각 변화를 관찰하였다. 관찰 결과는 48 시간이 경과되는 동안에 접촉각이 약 22.5° 로 거의 일정하게 유지되며 변화가 없었다. 이것은 시간이 경과되도 PDMS 표면에 친수성을 띄게 하는 PVP 분자들이 계속 남아있기 때문이다.

실제로 PVP 표면처리 효과를 제작된 바이오칩에 대해서 알아보기 위해서 표면처리한 혼합기와 표면처리를 하지 않은 혼합기에 검은 잉크가 섞인 물을 주입하여 현미경으로 관찰하였다. 관찰 결과는 Fig. 4와 같으며, 표면처리한 마이크로 혼합기에서는 기포가 형성되지 않고 잉크가 섞인 물이 채워지는 반면에 표면처리를 하지 않은 마이크로 혼합기에서는 기포가 형성됨을 알 수가 있다. 이것은 PDMS 표면의 소수성에 의해 채널 내에 액체가 잘 채워지지 않아서이다. 공기만 있던 채널이 유체로 채워지는 과정에서, 노즐과 기둥 주위에 지역적인 유체압력의 차이가 생기고, 지역적으로 유체압력이 PDMS 소수성에 의한 표면장력보다 큰 부분이 먼저 유체가 흐르게 된다. 이러한 유체의 불균일한 흐름이 기포를 형성시키는 주 원인이라 여겨진다. 본 연구에서는 이러한 기포발생 문제점을 0.25 wt. % PVP 용액을 이용한

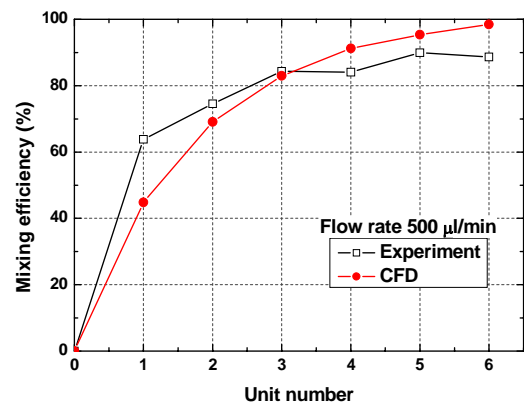
표면처리로 해결하였다.



(a)



(b)



(c)

Fig. 5 Comparison of mixing efficiency between experiment and simulation at each unit of the mixer. (a) Flow rate= 50 ul/min (b) Flow rate=300 ul/min (c) Flow rate=500 ul/min

3.2 마이크로 혼합기 혼합효율

바이오칩의 혼합부를 총 6 개의 유로 구간으로 나누어 유량이 50, 300, 500 l/min 일 때 실험을 수행하여 혼합효율을 구하고 시뮬레이션에서 계산된 값과 비교하였다. 그 결과는 Fig. 5 와 같다. 전반적으로 유량이 증가 할수록 혼합효율이 증가하였다. 시뮬레이션의 경우에는 유량이 증가함에 따라 혼합효율이 각각의 유량에 대해서 89.4, 96.1, 98.5 % 인 반면에 실제 실험을 통해서 구한 혼합효율은 약 69.1, 83.5, 89.9 %로 측정되었다. 대체적으로 유량이 증가할수록 실험값과 시뮬레이션 값이 근접하고 있다. 그러나 실험값과 시뮬레이션 값 사이에 차이가 생긴 것은 시뮬레이션에서 이중 두 유체의 혼합을 동종의 유체 사이의 혼합으로 해석할 수 밖에 없었기 때문인 것 같다. 그밖에, 해석에 사용된 설계수치에 대한 마이크로 혼합기의 가공오차와 광학현미경으로 혼합영상을 찍을 때에 정확히 채널 높이 방향으로의 가운데 부분에 초점을 맞추기 어려웠던 점 등도 원인이라 생각된다.

유량이 50 l/min 경우에는 유체가 혼합부의 1~6 구간을 지남에 따라 혼합 효율이 선형적으로 증가하였다[Fig. 5(a)]. 두 유체간 경계면 확산에 의해 혼합이 되는 경우에는 경계면 길이에 비례하여 혼합효율이 선형적으로 증가하게 된다. 따라서, 유량이 상대적으로 저속(50 l/min)일 때에는 마이크로 노즐과 기둥에 의해 야기되는 대류(convection) 효과 보다는 두 유체 계면에서의 확산에 의해 주로 혼합이 이루어지는 것으로 여겨진다. 두 유체가 마이크로 혼합기의 채널을 지나면서 점진적으로 천천히 혼합이 이루어진다고 하겠다. 하지만 유량이 300 및 500 l/min 경우[Fig. 5 (b), (c)]에는 유량이 50 l/min 일 때보다 혼합효율이 높게 이루어지고 있는데, 이것은 두 유체 계면에서 확산 효과뿐만 아니라 마이크로 노즐과 기둥에 의한 대류 효과에 의해 혼합이 이루어지기 때문이라 생각된다. 따라서 유량이 증가할수록 확산 이외에 노즐과 기둥에 의한 대류 효과가 증가되어 혼합효율도 증가된다고 하겠다.

Fig. 6 은 본 연구에서 제안된 마이크로 혼합기[Fig. 1(c)]와 두 가지 다른 형태의 마이크로 혼합기[Fig. 1 (a), (b)]에 대해서 유량에 따른 혼합효율을 비교한 결과이다. 전반적으로 실험으로 측정된 혼합효율이 시뮬레이션에 의한 예측 혼합효율보다 낮게 구해졌다. 그러나 실험으로 구한 혼합효율도 시뮬레이션에 의한 혼합효율과 유사한 경향을 보이고 있다. 마이크로 노즐만으로 혼합기가 구성된 경우에는 유량 변화에 관계없이 실험값이 31.6 ~ 32.5 %로 거의 일정한

혼합효율을 보이고 있다. 혼합기 채널에 노즐만 있는 경우에는 노즐과 두 혼합 유체의 경계면과 사이에 거리가 있기 때문인지, 유량이 증가하더라도 노즐에 의한 대류확산 혼합은 거의 영향이 없고 두 유체의 계면에서 농도차이에 의한 확산에 의해 혼합이 주로 이루어는 것으로 해석된다. 마이크로 기둥만 혼합기 채널 내에 존재하는 경우에는 유량이 증가함에 따라 실험값이 59.2 %에서 87.7 %로 혼합효율이 증가되었다. 이는 유량이 증가할수록 기둥에 의해 유체 흐름의 수직방향(Fig. 1 에서 Y 축 방향) 속도성분이 점점 증가하여 두 유체의 계면에서 농도차이에 의한 확산이 대류적인 확산에 의해 증폭되어지기에 혼합효율이 증가되었다고 여겨진다.

노즐과 기둥으로 구성된 혼합기의 경우에는 유량이 증가함에 따라 실험값이 71.0 %에서 88.2 %로 혼합효율이 증가되었다. 노즐과 기둥이 혼합된 경우에는 노즐에 의해 일차 발생된 유체의 수직방향 속도성분이 이차적으로 유체가 기둥에 부딪치게 되면서 두 혼합유체 경계면 쪽으로 수직방향의 속도성분이 상승되는 것으로 여겨진다. 유량이 커질수록 유체의 수직방향의 속도성분은 커지게 되고, 따라서 대류 확산이 활발하게 되어 혼합효율이 증가된 것으로 해석된다. 본 연구에서 제안한 노즐 및 기둥 혼합형이 기둥 단일형과 노즐 단일형보다 전반적으로 혼합효율이 높게 나왔다. 노즐 및 기둥 혼합형의 혼합효율이 유량이 큰 (>300 l/min) 경우에는 기둥 단일형과 큰 차이가 없었지만, 유량이 낮은 영역에서는 다른 단일형 혼합기들 보다 혼합효율이 높다. 기존에 발표된 다른 혼합기들의 효율이 유량 5~1200 l/min 에 대

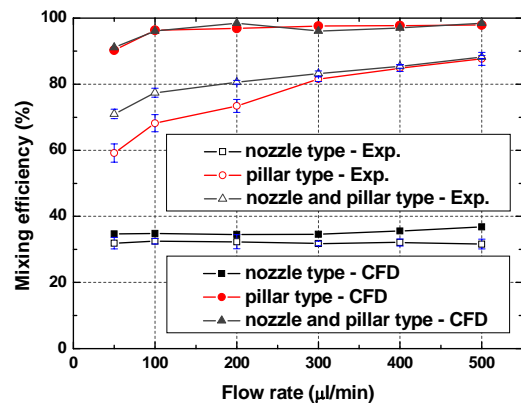


Fig. 6 Comparison of mixing efficiency between our new micromixer and other type micromixer according to flow rate

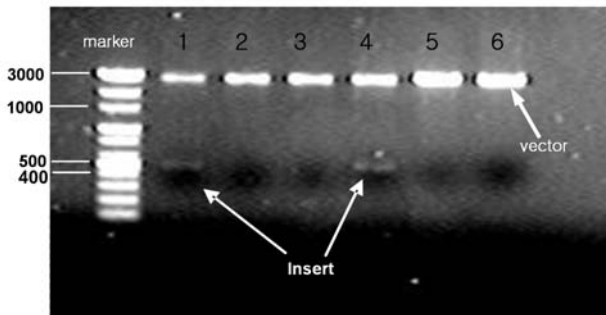


Fig. 7 Result of DNA ligation reaction by gel electrophoresis after Restriction enzyme was reacted

해서 80~98%인 것에 비교하여,^(11,16) 본 연구에서 제안된 노즐 및 기둥 혼합형 혼합기의 효율이 500 l/min 까지 측정된 결과 88.2%로서 비교적 좋은 결과를 얻었다. 이 보다 혼합효율을 증가시키기 위해서는 유량을 크게 하거나 노즐 및 기둥 수를 증가시켜 혼합기 채널길이를 늘리는 방법이 있겠다.

3.3 바이오칩에 의한 DNA 결찰

본 연구에서 제안한 칩에서 DNA 결찰을 수행하기에 필요한 시간을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 시료들을 각각 1, 3, 5 분 동안 칩 반응부에서 반응을 시킨 후에 DNA 결찰의 성공 여부를 조사하였다. 1 분 혹은 3 분 동안 바이오칩에서 DNA 결찰을 시킨 경우에는 흰색 군체가 형성되지 않거나 확인 불가능한 상태였다. 하지만 DNA 결찰 수행 시간이 5 분인 경우에는 확인 가능한 흰색 군체를 얻을 수 있었다. 따라서 DNA 결찰을 바이오칩에서 수행하기 필요한 최소 시간은 약 5 분으로 판단된다. 기존의 실험실 방법으로 DNA 결찰을 수행하면 보통 약 4 시간의 반응시간이 필요하다.⁽¹⁸⁾ 하지만, 본 연구에서 제안한 바이오칩을 이용하면 DNA 결찰을 매우 짧은 5 분에 실행할 수 있음을 알 수가 있었다.

바이오칩에서 DNA 결찰을 5 분 동안 수행한 결과물을 앞서 설명한 방법으로 DNA 클로닝을 수행하고, 총 6 개의 흰색 군체에서 재조합된 플라스미드를 추출하여 제한효소로 DNA 단편으로 자른 후에 젤 전기영동한 결과 사진이 Fig. 7 과 같다. 젤 전기영동된 사진에서 왼쪽에 표지된 크기 지표(marker)의 위치와 분리된 DNA 단편들의 위치를 비교해 보면, 6 개 흰색 군체에 모두에서 2728 bp 크기의 플라스미드 벡터는 모두 검출되었다. 하지만 440 bp 크기의 HIV1 인서트는 1 번과 4 번 흰색 군체에서만 검출되고 있다. 나머지 경우에는 DNA

결찰 과정에서 HIV1 DNA 단편이 플라스미드에 삽입이 되지 않았음을 알 수가 있다. 이것은 DNA 결찰 중이나 후에 형질전환을 하고 세포를 배양할 때에 오염되어 HIV1 이외의 다른 DNA 단편이 플라스미드에 삽입된 상태로 재조합이 된 것으로 추측된다. 오염되어 삽입된 DNA 단편의 크기가 너무 크거나 작아서 Fig. 7 의 전기영동 사진에는 나타나지 않은 것 같다. 이러한 경우는 철저한 실험순서에 의한 진행으로 오염을 최소화 시킬 수 있다. 실험 결과로부터, 바이오칩에 의해 DNA 결찰이 원활히 실행되었음을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

마이크로 노즐과 기둥으로 이루어진 간단한 형태의 마이크로 혼합기와 채널형 반응기가 있는 DNA 결찰용 바이오칩을 PDMS 복사형틀법으로 제작하였다. 시료 주입시 PDMS 의 소수성으로 인해 기포가 발생하는 문제점은 0.25wt.% PVP 용액으로 표면처리 함으로써 반응구적으로 해결하였다. 새로이 개발된 마이크로 혼합기는 노즐 및 기둥에 의해 형성되는 대류확산에 의해 혼합효율이 증폭되는 효과를 보였으며, 유량이 증가할수록 혼합효율이 증가되었다. 길이가 10.33mm 인 마이크로 혼합기는, 500 l/min 유량에서 88.2%의 좋은 혼합효율을 나타냈다. 제작된 바이오칩으로 DNA 결찰을 원활히 실행할 수 있었으며, DNA 결찰 시간을 기존의 실험실 방법에서 걸리던 4 시간에서 매우 짧은 5 분으로 단축시킬 수 있었다. 본 연구에서 제안한 DNA 결찰용 바이오칩은 향후에 DNA 재조합을 위한 마이크로 바이오칩 시스템 개발에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- (1) Burns, M. A., Johnson, B. N., Brahmamandra, S. N., Handique, K., Webster, J. R., Krishnan, M., Sammarco, T. S., Man, P. M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C. H. and Burke, D. T., 1998, "An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device," *Science*, Vol. 282, pp. 484-487.
- (2) Deng, H. Y., Zhang, X. E., Mang, Y., Zhang, Z. P., Zhou, Y. F., Liu, Q., Lu, H. B. and Fu, Z. J., 2004, "Oligonucleotide Ligation Assay-Based DNA Chip for Multiplex Detection of Single Nucleotide Polymorphism," *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 19, pp. 1277-1283.
- (3) Cho, C.-H., Cho, W., Ahn, Y. and Hwang, S.-Y., 2006, "PDMS/Glass Serpentine Microchannel Chip for

- PCR with Bubble Suppression in Sample Injection,” *Trans. of the KSME (A)*, Vol. 30, No. 10, pp. 1261~1268.
- (4) Jayaraj, S., Kang, S. M. and Suh, Y. K., 2007, “A Review on the Analysis and Experiment of Fluid Flow and Mixing in Micro-Channels,” *Journal of Mechanical Science and Technology*, Vol. 21, No. 3, pp. 536~548.
- (5) Hessel V., Lowe, H., Schonfeld, F., 2005, “Micromixers - A Review on Passive and Active Mixing Principles,” *Chem. Eng. Sci.*, Vol. 60, pp. 2479~2501.
- (6) LU, L. H., Ryu, K. S. and Liu, C., 2002, “A Magnetic Microstirrer and Array for Microfluidic Mixing,” *J. Microelectromech. Syst.*, Vol. 11, pp. 462~469.
- (7) Tsai, J. H. and Lin, L. W., 2002, “Active Microfluidic Mixer and Gas Bubble Filter Driven by Thermal Bubble Micropump,” *Sensors Actuators A*, Vol. 97~98, pp. 665~671.
- (8) Kim, D. S., Lee, S. H., Kwon, T. H. and Ahn, C. H., 2005, “A Serpentine Laminating Micromixer Combining Splitting/Recombination and Advection,” *Lab Chip*, Vol. 5, pp. 739~747.
- (9) Hong, C. C., Choi, J. W. and Ahn, C. H., 2004, “A Novel In-Plane Passive Microfluidic Mixer with Modified Telas Structures,” *Lab Chip*, Vol. 4, pp. 109~113.
- (10) Lin, C. H., Tsai, C. H. and Fu, L. M., 2005, “A Rapid Three-Dimensional Vortex Micromixer Utilizing Self-Rotation Effects under Low Reynolds Number Conditions,” *J. Micromech. Microeng.*, Vol. 15, pp. 935~943.
- (11) Liu, R. H., Stremmer, M. A., Sharp, K. V., Olsen, M. G., Santiago, J. G., Adrian, R. J., Aref, J. H. and Beebe, D. J., 2000, “Passive Mixing in a Three-Dimensional Serpentine Microchannel,” *J. Microelectromech. Syst.*, Vol. 9, pp. 190~197.
- (12) 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.
- (13) Suh, Y. K. and Heo, H. S., 2002, “A Numerical Study on Stirring Characteristics in a Microchannel with Various Arrangement of Blocks,” *Trans. of the KSME (B)*, Vol. 27, No.7, pp. 901~908.
- (14) Kim, K.-m., Shin, Y.-s., Lee, D. and Ahn, Y.-m., 2007, “Mixing Efficiency Evaluation in Y-channel Micromixer Using LIF Confocal Microscope,” *Trans. of the KSME (B)*, Vol. 31, No. 2, pp. 159~166.
- (15) Giordano, B. C., Copeland, E. R., Landers, J. P., 2001, “Towards Dynamic Coating of Glass Microchip Chambers for Amplifying DNA via the Polymerase Chain Reaction,” *Electrophoresis*, Vol. 22, pp. 334~340.
- (16) Lee, S. W., Kim, D. S., Lee, S. S and Kwon, T. H., 2006, “A Split and Recombination Micromixer Fabricated in a PDMS Three-Dimensional Structure,” *J. Micromech. Microeng.* Vol. 16, pp. 1067~1072.
- (17) Wilkinson, A., Smith, A., Bullard, D., Lavesa-Curto, M., Sayer, H., Bonner, A., Hemmings, A. and Bowater, R., 2005, “Analysis of Ligation and DNA Binding by Escherichia Coli DNA Ligase (LigA),” *BBA-Proteins Proteomics*, Vol. 1749, pp. 113~122.
- (18) Joseph Sambrook and David W. Russell, 2001, *Molecular Cloning (third edition)*, CSHL PRESS, Vol. 1, pp.1.84~1.87.