

<학술논문>

DOI:10.3795/KSME-A.2008.32.12.1115

주화성에 의한 활동성 정자 분리용 마이크로 바이오칩에 관한 연구

고용준* · 맹준호** · 안유민† · 황승용***

(2008년 8월 21일 접수, 2008년 11월 7일 수정, 2008년 11월 19일 심사완료)

A Study About Microbiochip for Separation of Motile Sperm by Using Chemotaxis

Yongjun Ko, Joon-Ho Maeng, Yoomin Ahn and Seung Yong Hwang

Key Words : Microchip(마이크로칩), Chemotaxis(주화성), Concentration Gradient(농도차), Motile Sperm(운동성 정자), Attractant(유도물질), Dilution(희석)

Abstract

This paper presents a new microchip which can separate motile sperm by chemotaxis. The microchip was developed to create longitudinal concentration gradient in the microchannel due to diffusion. Linearly good concentration gradient of chemoattractant was generated without any fluid control devices. In sperm separation experiment with the developed microchip, mouse sperm was used as sample and acetylcholine was selected as chemoattractant. Human tubal fluid (HTF), buffer solution, was introduced into the microchannel of the microchip and attractants diluted in ratio of 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 and 1/64 including control (DI water) were dropped in each outlet by 2 μ l volume with micropipette. After 5min, 1 μ l sperm solution was dropped into inlet of the chip. After 10 min, when sperms reached to the outlet by chemotaxis, we counted sperms in each outlet by using microscopy. Consequently, we could separate progressive motile sperm with the new microchip. In the experiment, the most sperms were isolated at the outlet dropped with 1/16 diluted solution. The optimal concentration gradient to induce chemotaxis was about 0.625 mg/ml/mm.

1. 서론

현재까지 체내 수정 과정의 기작에 대해서 명확하게 밝혀지지 않았다. 아직도 수정 과정의 기작에 대해서 여러 많은 연구자들이 연구 중에 있으며 과정의 일부에 대해서만 추측을 하고 있다. 그 중에서 가장 널리 알려진 메커니즘이 정자의 주화성(chemotaxis)과 주열성(thermotaxis)이다.⁽¹⁾ 주열성은 온도 차이에 의한 온도구배(temperature gradient)가 형성

되어 이를 세포가 감지하여 이동하는 성질을 말한다. 체내수정을 하는 포유류의 정자는 이러한 성질이 있는 것으로 보고되고 있다.⁽²⁾ 사정된 정자들은 자궁경부(cervix)를 지나고 난 뒤에, 자궁(uterus)과 난자(ovum)가 배란되는 난관(uterine tube) 이음부인 난관협부(tubal isthmus)에 도착하게 된다. 이 부분이 정자들이 머물게 되는 부분(storage site)이다. 난자가 난소(ovary)에서 배란(ovulation)이 되면 정자가 머물게 되는 난관협부와 수정이 이루어지는 장소(fertilization site)인 난관 팽대부(ampulla of uterine tube) 사이에 온도차가 생기게 된다. 이 온도차를 정자들이 감지하여 난관을 통과하고 난자가 있는 부근까지 이동한다고 보고되어 있다.⁽¹⁾ 또한 주열성은 난자와 정자가 멀리 떨어져 있을 때(long range) 작용한다고 추측되고 있다. 정자가 난자 근처에 도달하면(short range), 난자가 분비하는 화학유인물질에 의해 난자가 있는 곳까지 유

* 한양대학교 대학원 기계공학과
** 한양대학교 대학원 생화학과
† 책임저자, 회원, 한양대학교 기계공학과
E-mail : ahnym@hanyang.ac.kr
TEL : (031)400-5281 FAX : (031)406-5550
*** 한양대학교 분자생명과학부, (주)지노텍

도된다. 이처럼 유인물질의 농도가 점점 높아지는 곳으로 이동하게 되는데, 유인물질 농도의 차이에 의한 농도구배(concentration gradient)가 형성되었을 때 세포가 이동하는 성질을 주화성(chemotaxis)이라고 한다. 이러한 정자의 주화성은 이미 많은 연구를 통해 밝혀지고 있다.⁽⁶⁾ 하지만 아직까지 난자가 방출하는 화학 유인물질의 조성은 완전하게 밝혀지지 않았다. 다만 시험관내 실험(*in vitro* assay)에 의해 각 동물종마다 소수의 물질이 보고되어있다.⁽¹⁾ 이러한 정자의 주화성과 주열성에 대한 연구를 통해 궁극적으로 인간 수정의 메커니즘을 밝힌다면, 불임부부의 수를 줄이고 더 나아가 건강한 후손을 얻을 수 있을 것이다.

전세계적으로 환경호르몬, 스트레스, 불규칙한 식습관, 출산의 고령화로 인한 불임 부부의 수가 증가하고 있다. 불임이란 정상적인 부부생활을 시작하여 1년이 지나도록 임신이 되지 않는 경우를 말하며 그 원인에는 남성적인 요인과 여성적인 요인 그리고 원인불명 등의 요인이 있다. 특히 최근에는 남성불임 요인이 증가 추세에 있다. 과거에는 여성 요인이 높은 비율을 차지하였으나 해마다 환경오염, 과로, 스트레스, 지나친 흡연이나 음주 등에 의한 남성 불임환자의 증가로 남녀간 유사한 비율을 나타내고 있다. 이렇게 불임이라고 진단 받은 부부들은 정상적인 방법을 통한 수정이 불가능하기 때문에 체외수정(IVF, *in vitro* fertilization)이라 불리는 기술인 시험관 수정이나 세포질내 정자 주입법(ICSI, intracytoplasmic sperm injection)을 통해 인공수정을 해야만 한다.⁽⁶⁾ 이렇듯 시험관 수정이나 세포질내 정자 주입법을 시술하기 위해서는 운동성 있는 정자를 얻기 위한 정자 처리과정(Sperm processing)이 반드시 필요하다.

남성불임을 보이는 정액샘플에서 운동성 정자를 분리하여 채취하는 방법에는 현재까지 네 가지 기술이 사용되고 있다.⁽⁷⁾ 사용되고 있는 네 가지 정자 분리 기술들은 모두 원심분리기에 의해 정액에 포함되어 있는 다른 성분들과 정자를 분리하는 과정이 포함되어 있는데, 이것은 정자에게 치명적인 손상을 줄 수가 있다. 또한 현재 사용중인 방법들은 운동성 정자의 회수율이 떨어지기 때문에, 대부분 일반적인 시험관 수정에만 적용가능하며 오랜 시간과 많은 노동력이 요구되고 있다. 그리고 세포질 내 정자 주입법을 시술하기 전에 의사가 죽어있는 정자와 세포잔해 사이에서 활동성 정자를 직접 육안으로 보면서 선별하기 때문에 시간이 많이 걸리고 주관적인 판단이 개입될 수 밖에 없다. 따라서 남성불임을 보이는 남자의 정액샘플에

서 좋은 정자만을 효율적으로 선별해 내는 새로운 방법의 개발이 시급하다.

최근에 이러한 요구가 대두되면서 생화학 분야와 MEMS기술이 융합된 바이오멤스 기술을 이용하여 정자를 분리하는 마이크로바이오칩에 대한 연구가 진행되고 있다.⁽⁸⁻¹²⁾ Horsman 등⁽⁸⁾은 죽은 정자와 상피세포를 유리(glass) 바이오칩에 형성된 마이크로 채널을 통해 중력과 무게 차이를 이용하여 죽은 정자만을 분리하였고, Kricka 등⁽⁹⁾은 실제 사람 정자를 이용하여 유리 바이오칩에 형성된 마이크로 채널에서 일정시간 동안 정자들이 이동한 거리를 기준으로 정자의 활동성(mobility)을 판별하였다. Cho 등⁽¹⁰⁾은 Polydimethylsiloxane(PDMS)로 제작된 마이크로칩에서 주입구(inlet)와 배출구(outlet)의 높이 차에 의해 생기는 층류(laminar flow)를 이용하여 활동성 정자, 비활동성 정자 및 세포잔해가 섞인 샘플에서 정자의 운동성(mobility)만으로 활동성 있는 정자를 분리하였다. Clark 등⁽¹¹⁾은 자궁관을 모방한 PDMS로 제작된 마이크로칩을 이용하여 돼지 난자의 다정자 수정을 방지하고 하나의 정자만 수정되도록 마이크로 채널 중간 윗부분에 난자가 걸리도록 설계하고 주입구에 주입되는 샘플의 체적에 의해 생기는 압력에 의해 샘플 유체가 흐르게 되어 정자가 난자에 수정되는 실험을 수행하였다. Koyama 등⁽¹²⁾은 높이 차에 의한 압력 유도 방식과 채널 단면에서의 확산을 이용하여 마이크로 채널 내에 유도물질의 농도 구배를 형성시켜 주화성에 의한 쥐 정자의 분리실험을 수행하였다. 하지만 선행연구들은 마이크로채널에서 발생하는 특징 중 하나인 층류를 이용하였다. 이러한 방법은 유동에 의해 정자를 분리 하기 때문에 유동을 형성시키기 위해 실린지 펌프와 같은 부가장치가 필요하고 시료의 양도 많이 요구된다. 뿐만 아니라 채널 내에서의 층류 흐름이 오히려 정자의 자연적 활동을 방해하여 순수하게 직진운동성이 있는 정자만을 특이적으로 분리해 내지 못한다는 단점이 있다.

이러한 단점을 극복하기 위해서 본 연구에서는 층류 현상이 필요치 않는, 즉 실린지 펌프와 같은 유동발생 장치가 필요 없는 운동성 정자의 분리용 마이크로바이오칩을 설계 및 제작하였다. 실제로 쥐 정자(mouse sperm)를 이용하여 제작된 칩의 마이크로 채널 내에서 주화성에 의해 활동성 정자를 분리하였다. 실험결과를 통해 쥐 정자들의 주화성 반응 여부를 검증하고 활동성 정자를 유도하기 위한 유도물질의 최적 농도구배를 구하였다.

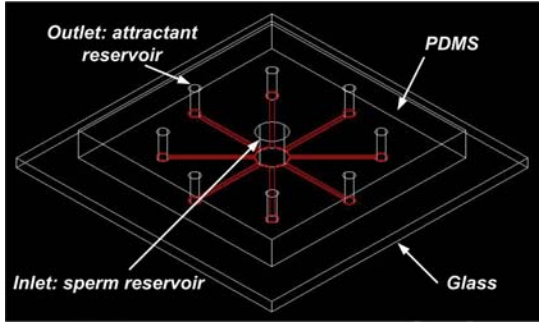


Fig. 1 Design of microbiochip for sperm separation

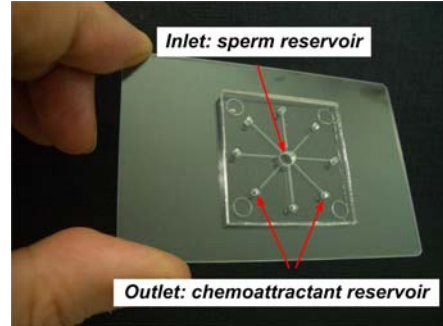


Fig. 2 Photograph of fabricated microchip for sperm separation

2. 활동성 정자 분리용 마이크로 바이오 칩 설계 및 제작

본 연구에서 제안된 마이크로칩의 설계는 Fig. 1과 같다. 설계된 마이크로 칩은 직경이 4 mm인 주입구(inlet) 1 개, 직경이 2 mm인 배출구(outlet) 8개와 길이가 10 mm인 마이크로 채널들 8개가 형성되어 있는 PDMS층과 유리기판으로 구성되어 있다. 설계된 칩에서 마이크로 채널은 일반적으로 쥐 정자의 속도가 1~1.2 mm/min이므로 길이를 10 mm로 정하였다. 그리고 유도물질의 최적 농도 구배 범위를 찾고 실제 정자들이 그 농도구배에서 주화성에 의한 분리가 잘 되는지 용이하게 관찰하기 위해서, 정자샘플을 주입하기 위한 주입구(inlet)를 가운데 위치시키고 유도물질이 놓일 활동성 정자 배출구(outlet)를 방사형으로 설계하였다.

칩 재료로서 생화학적으로 안정하고 광학특성이 우수한 PDMS와 유리를 이용하였고 설계된 마이크로칩의 제작 공정은 다음과 같다. 우선, 실리콘 기판 위에 음성 감광제(SU-8 3050, MicroChem Corp., USA)를 도포하여 100 μ m 후막을 형성시킨 후 포토리소그래피(photolithography) 공정을 통하여 몰드(mold)를 제작한다. 제작된 몰드에 PDMS와 경화제가 10:1로 섞인 혼합물을 부어 65 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 오븐(oven)에서 경화시킨 후 몰드에서 PDMS를 분리하여 기계적인 펀칭으로 주입구와 배출구를 형성시키면 최종적으로 PDMS층이 완성된다. 제작된 PDMS 층과 슬라이드 글라스(Matunami, Japan, 50 \times 75 mm, Thickness: 1.3mm)를 O₂ Plasma treatment를 통하여 접합하면 최종적으로 우리가 원하는 칩이 완성된다. 최종적으로 제작된 칩은 Fig. 2와 같다.

3. 재료 및 실험

3.1 실험재료

본 연구에서는 주화성을 이용한 활동성 정자의

분리 실험을 위해 쥐 정자(mouse sperm)를 이용하였다. 왜냐하면 구입이 용이하고 인간의 정자와 유사하며, 또한 일반적으로 포유류 정자는 길이와 외형이 약간 다를 뿐 행동 성향이나 기본적인 기관의 구조와 기능은 거의 같기 때문에 인간 정자의 주화성에 대한 반응을 예측할 수 있기 때문이다. 우선 정자를 채취하기 위해 6~8주 이상의 수컷 outbred ICR mouse(Samtako, INC, Korea)를 구입하였다. 추출된 정자들이 체외에서 살 수 있도록 하기 위해 사람의 난관 체액과 조성이 유사한 HTF(human tubal fluid) medium을 Chemicon international, Inc. 에서 구입하여 사용하였다. 화학 유도물질로서는 아세틸콜린(acetylcholine)을 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 아세틸콜린은 쥐 정자들에게 주화성을 일으키는 것으로 추정되는 물질 중 하나이다. 그리고 채널 내에서 유도물질 확산이 제대로 일어나는지를 확인하고 확산된 결과를 정량화하기 위해 형광물질인 Rhodamine B(M.W 479.01, Fluka[®], UK)를 사용하였다.

3.2 실험방법

마이크로채널 내에서 화학 유도물질의 화학적 농도 구배(chemical concentration gradient)가 채널 길이방향으로 선형적으로 잘 형성되는지를 확인하고 길이방향으로 확산된 결과를 정량화 하기 위해 형광실험을 첫 번째로 수행하였다. 우선 제작된 칩에 약 30 ~ 40 μ l HTF medium을 채운 후 배출구에 Rodamine B 2 μ l를 마이크로 피펫을 이용하여 떨어뜨린 후 37 $^{\circ}$ C로 유지되고 있는 항온조(dry bath)에 넣어두고 경과시간이 5분일 때와 20분일 때에 각각 공초점 형광 현미경(Confocal Laser Scanning Scope, CLSM)을 이용하여 형광측정 및 관찰을 수행하였다. 형광측정은 총 3번 측정하여 평균값을 계산하였다. 여기서 항온조에 넣어두는 이유는 정자가 체내 온도 조건에서 활동하기 때문에

동일한 조건에서 실험을 수행하기 위함이다.

형광실험을 통해 얻은 결과를 바탕으로 제작된 칩에서 과연 주화성에 의한 정자들이 이동하는지를 확인하는 실험을 수행하였고 정자들이 실험에 적용된 유도 물질의 다양한 농도 구배 중에서 어떤 농도 구배에서 제일 강한 주화성을 나타내는지 알아보기 위한 농도 구배 최적화 실험을 수행하였다. 우선, 구입한 쥐를 경추탈골 시킨 후 해부용 가위를 이용하여 개복하여 두 개의 부고환(epididymis)을 추출한다. 추출된 부고환은 미리 준비된 1 mL HTF solution이 들어 있는 마이크로 튜브(microtube)에 넣고 37°C로 유지되고 있는 항온조에 보관한다. 추출된 부고환을 500 μL HTF solution이 들어 있는 페트리디쉬(petridish)에 넣어 주사바늘을 이용하여 살짝 누르면서 짜주어 부고환 안의 정자가 잘 나올 수 있게끔 배양접시를 5분 동안 서서히 양 옆으로 흔들어서 준다. 배양접시에 들어 있는 부고환과 이물질을 제거하고 각각 100 μL 씩 마이크로 튜브에 분주한 후 37°C로 유지되고 있는 항온조에 저장하고 각각의 마이크로 튜브에서 1 μL 씩 추출하여 계수측정기(cytometer)를 통해 정자의 개수를 계산한다. 그 후 준비된 칩에 약 30~40 μL HTF medium을 채운 후 유도 물질인 아세틸콜린을 일정 비율(1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64)로 희석시킨 용액과 대조군(control)으로 사용된 DI water를 마이크로 피펫(micropipet)을 이용하여 배출구에 각각 2 μL 씩 떨어뜨린 후 유도물질이 마이크로채널 내에서 농도구배를 형성시키기 위해 37°C로 유지된 항온조에 5분 동안 넣어둔다. 5분 후 주입구에 1 μL 의 정자가 섞인 용액을 떨어뜨린 후 10분 동안 37°C로 유지된 항온조에 넣어둔다. 마이크로칩을 항온조에 10분 동안 넣어두는 이유는 쥐 정자의 운동속도가 1~1.2 mm/min이기 때문에 10분 후면 배출구에 도달할 수 있을 것으로 예상되기 때문이다. 10분 후 현미경을 통하여 배출구에 도달 한 정자 수를 측정하였다. 일정 비율로 희석시킨 유도 물질에 대해 총 30번 반복실험을 수행하였다.

4. 실험 결과

4.1 마이크로채널 내 유도물질의 농도구배

임의의 분자에 대한 확산계수는 다음과 같이 계산할 수 있다.⁽¹³⁾

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad (1)$$

식 (1)에서 k 는 볼츠만상수, T 는 절대온도, η 는

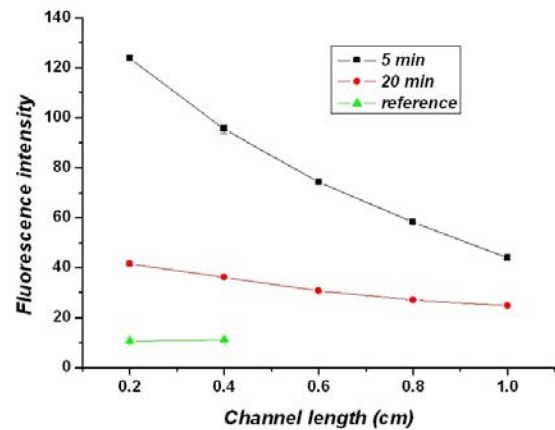


After 5 min



After 20 min

(a)



(b)

Fig. 3 Result of concentration gradient according to channel length when 2 μL Rhodamine B was dropped into outlet: (a) photograph of microchannel after 5min and 20min, and (b) fluorescence intensity as a function of length in channel.

분자가 담겨 있는 용액의 점성계수, a 는 분자의 유효크기로 보통 $a = \sqrt[3]{MW}$ 으로 근사화 할 수 있다. 여기서 MW 는 분자의 분자량이다. 따라서 본 연구에서 사용된 유도물질인 아세틸콜린과 형광물질인 Rhodamine B의 확산계수를 계산하여 보면 각각 약 $5.71 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 과 $4.132 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 이다. 각각의 확산계수는 용액을 물로 가정하고 37°C 온도에서 계산된 값이다. 계산된 값으로 두 물질의 확산계수를 비교해보면 아세틸콜린의 확산계수가 Rhodamine B의 확산계수보다 약간 크지만 거의 비슷한 값을 가지는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 아세틸콜린대신 형광물질인 Rhodamine B를 이용하여 화학적 유도물질이 마이크로채널 내에서 길이 방향으로 선형적으로 농도차가 형성되는지 정량적으로 측정하였고 그 결과는 Fig. 3과 같다. Fig.

3(a)에서 보는 바와 같이, 5분 동안 형광물질의 확산시간을 준 후 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 모든 채널에서 형광물질의 농도 구배가 선형적으로 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 약 20분 후 다시 농도 구배를 형광현미경으로 관찰한 결과 비록 시간경과에 의해서 형광세기가 줄어들었다. 이것은 형광현미경에서 조사된 레이저에 의해 발광된 형광물질이 갖고 있던 형광세기를 잃어버리면서 소멸하기 때문이다. 따라서 형광세기가 줄어들기는 하였지만 채널길이 방향에 따라 형성된 농도 구배가 선형적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3(b)). 이 결과로부터 본 연구에서 제작된 마이크로칩에서 주화성 반응을 일으키기 위한 길이방향으로의 선형적인 농도 구배가 잘 형성됨을 확인할 수 있었다. 따라서 유체의 흐름 상태에서 흐름방향의 수직으로의

확산을 이용하는 기존의 연구방법과는 달리, 제작된 마이크로 칩에서는 채널의 길이방향으로 단순한 화학물질의 특성인 확산작용에 의해 형성되는 농도구배를 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

4.2 정자의 주화성 반응

정자들이 마이크로칩상에서 농도 구배에 의한 주화성에 반응하는지를 확인하기 위해 Fig. 4(a)와 같이 배출구들에 투입되는 유도물질의 농도들을 세가지 경우로 달리하여 실험을 수행하였다. 수행 결과인 Fig. 4(b)에 의하면, 모든 배출구에 화학유인물질의 대조군(control)으로 사용된 탈이온수(deionized water, D.I water)들만 넣은 경우(case#1 in Fig. 4 (b)) 거의 정자들이 반응하지 않았다. 이것은 정자들이 탈이온수가 정자들을 유인하는 화학물질이 아님을 감지하기 때문이다. 하지만 1~2 마리의 정자들이 배출구에서 발견할 수 있었는데 이것은 정자들이 살아있는 세포이며 활동성이 강해서 무작위로 움직이기 때문에 주입구에 연결된 채널에 우연히 들어간 정자가 배출구까지 무작위 운동(random motion)으로 간 것으로 예측된다. 또한 8 개의 배출구 중 1곳만 화학 유인물질인 1/16으로 희석된 아세틸콜린을 넣은 경우(case#2 in Fig. 4 (b))에는, 아세틸콜린을 떨어뜨린 배출구에 다른 배출구에 비해 상대적으로 많은 정자들이 있음이 관찰되었다. 따라서 정자들이 화학물질의 농도구배에 의한 주화성에 반응한다는 사실을 결과를 통해서 확인할 수 있었다. 그리고 두번째 경우와 반대인 경우, 즉 8개의 배출구 중 1곳에만 탈이온수를 떨어뜨리고 나머지는 1/16로 희석된 아세틸콜린을 떨어뜨린 경우(case#3 in Fig. 4 (b)) 탈이온수를 떨어뜨린 배출구에 상대적으로 적은 정자들이 있음을 확인할 수 있었다. 결국, 이 실험을 통해 제작된 마이크로칩 상에서 정자들이 농도 구배에 의한 주화성에 반응하는 것을 확인하였다.

4.3 정자 분리 및 유도물질의 농도 최적화

쥐 정자가 주화성을 가장 강하게 보이는 아세틸콜린의 최적 농도구배를 찾는 동시에 채널 내에서 형성된 농도구배를 이용하여 활동성 있는 정자를 분리하는 실험을 수행한 결과는 Fig. 5와 같다. 실험은 총 30회 반복 하였으며, 각각 배출구에 도착한 정자 개수를 8개 배출구 모두에 도착한 정자들 총합계 개수로 나눈 값을 퍼센트로 하여 Fig. 5에 나타내었다. 그리고 축정은 정자개체수/ μl 인데 Fig. 5의 Y축 단위를 sperm percentage로 나타낸 이유는 총30번 실험 수행 시 매회마다 주입구 샘플의 정자밀도가 달라지게 된다. 따라서 배출구에서의

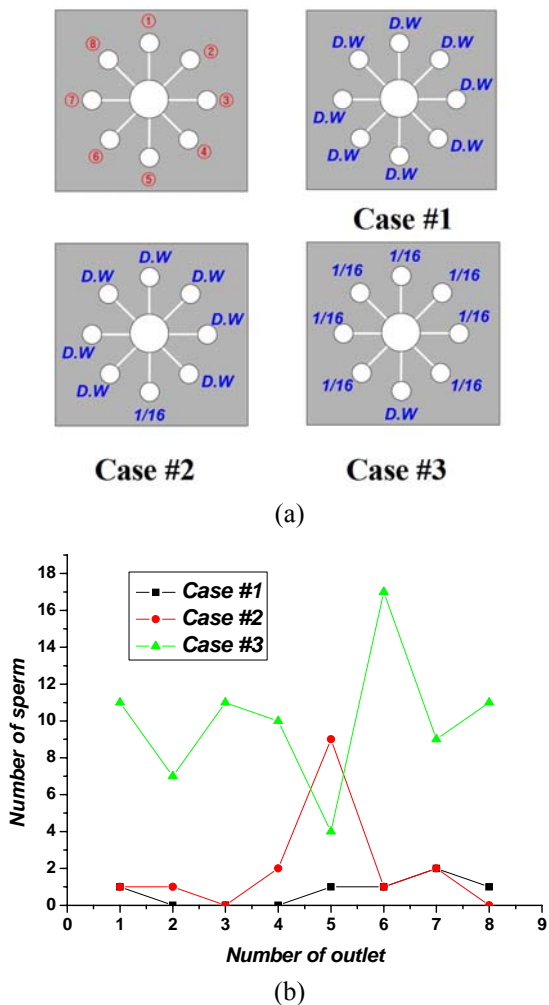


Fig. 4 Result of mouse sperm reaction about chemotaxis: (a) three cases for ensuring chemotaxis of mouse sperm, (b) number of sperm reached each outlet according to three cases

측정 결과를 정자수로 나타내게 되면 매회마다 도착한 정자수의 편차가 커지게 된다. 이러한 영향을 줄이기 위해 도착한 정자수의 퍼센트로 나타내었다. 실험결과, 아세틸콜린이 1/16 비율로 희석된 희석액을 떨어뜨린 배출구에서 다른 배출구에 비해 도착한 정자수가 상대적으로 많았다. 이것은 다른 배출구 농도들 보다 1/16 비율로 희석된 아세틸콜린이 투입된 배출구 농도에 의해 채널 내에 만들어진 농도구배가 쥐 정자의 주화성을 가장 강하게 유도함을 나타낸다. 배출구에 투입된 유도물질이 채널을 따라 확산되면서 주입구에 도착된 후에 배출구와 주입구에서의 유도물질의 농도변화는 측정할 수 없었다. 하지만 유도물질이 투입된 후에 정자 수 측정시간인 15분까지는 주입구와 배출구에서의 유도물질의 농도변화는 그리 크지 않을 것이라 여겨진다. 배출구와 주입구에서의 유도물질의 농도 변화가 무시할 만하다고 가정한다면, 쥐 정자의 주화성 유도하는 화학적 물질인 아세틸렌의 최적 농도구배는 0.625 mg/ml/mm가 된다. 실험결과, 유도물질 희석 비율이 증가함에 따라 쥐 정자의 주화성 반응도 증가한다. 하지만 농도구배가 0.625 mg/ml/mm를 정점으로 이 보다 더 커지게 되면, 주화성 반응도는 반대로 감소된다고 하겠다. 또한 본 논문의 목적은 체외수정을 위한 가장 활동성 있는 정자를 선별하는데 있으므로 체외수정 시 여러 마리 정자가 필요한 것이 아니므로 본 방법으로 선별한 정자를 임상실험에 사용되는 것은 충분히 가능할 것으로 생각된다.

Fig. 5에서 오차 막대가 비교적 크게 나타나고 있다. 총 30회의 실험에서 쥐 개체를 총 6마리를 사용하였는데 각 마리당 5회 실험을 수행하였다. 이때 각 개체마다 추출한 정자의 밀도(정자 개체 수/ μl) 차이에서 측정 오차가 기인 하였다고 추측된다. 또한 실험시간이 지나면 지날수록 정자의 활동성이 떨어지는 것을 현미경 관찰로 확인할 수 있었다. 이렇듯 시간에 따른 정자의 활동성 감소도 오차를 발생시키는 원인이라고 생각된다. 그리고 Fig. 5에서 보면, 대조군인 D.I water가 있는 쪽으로도 소수의 정자가 가는 것으로 측정되었다. 이것은 정자의 무작위 운동성(random mobility)에 기인하는 것으로 정자 자체가 운동성을 갖고 있기 때문에 아무런 화학적 영향이 없는 상황에서도 끊임없이 움직이기 때문에 이러한 결과가 나왔다고 예상된다.

Fig. 6은 아세틸콜린이 1/16로 희석된 용액을 떨어뜨린 배출구에 주화성에 의해 정자가 모인

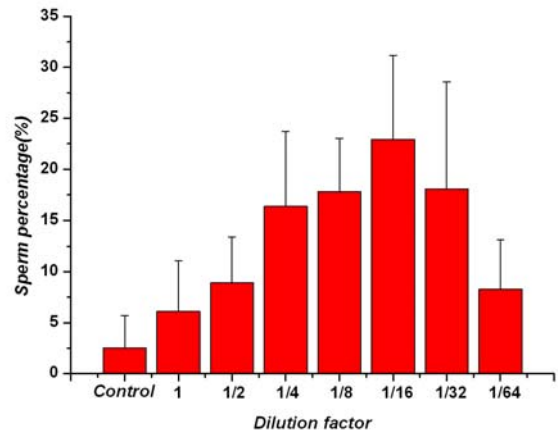
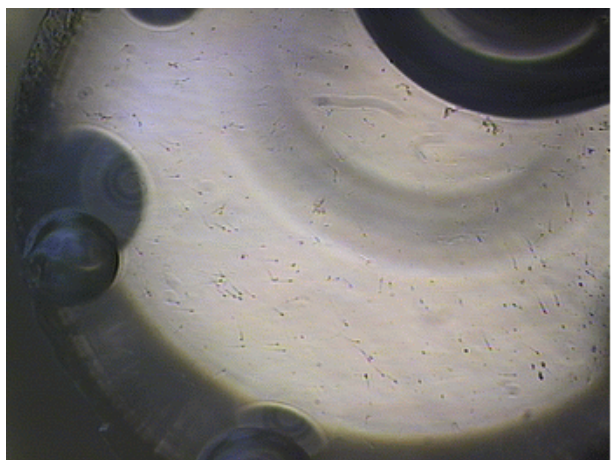


Fig. 5 Separated sperm percentage according to dilution factor of acetylcholine



(a)



(b)

Fig. 6 Photograph of separated sperm by the proposed microchip at outlets introduced with (a) control and (b) 1/16 diluted acetylcholine solution

모습(Fig. 6(b))과 대조군으로 사용한 DI water를 떨어뜨린 배출구를 현미경으로 관찰한 모습(Fig. 6(a))이다. 쥐 정자에 대한 화학적 유도물질인 아세틸콜린을 1/16으로 희석시킨 용액을 떨어뜨린 배출구에는 정자의 주화성에 의해 정자들이 모여있는 것을 현미경 사진을 통해 알 수 있다. 하지만 대조군인 탈이온수를 떨어뜨린 배출구에는 정자가 거의 없음을 확인할 수가 있다. 이것은 탈이온수가 정자를 유도하는 화학물질이 아니기 때문이다. Fig. 6에서 사진 주변에 둥그렇게 보이는 것은 기포(bubble)이다. 마이크로칩을 HTF medium로 채우고 나서 유도물질을 배출구에 떨어뜨린 다음 5분 후에, 정자를 주입구에 주입하게 된다. 그리고 10분 후에 배출구의 정자 개수를 측정하게 된다. 이 과정에서 총 15분을 37°C로 유지되는 항온조에 마이크로칩이 놓이게 된다. 마이크로칩 제작에 있어서, 기계적인 펀칭으로 PDMS 층에 배출구와 주입구를 만들게 되는데, 이때에 펀칭된 부위 표면이 거칠어지게 된다. 배출구와 주입구 표면이 거칠어서 HTF 용액이 주입되어도 완전하게 적셔지지 못하게 된다. 배출구 표면의 적셔지지 않은 부분에 공기가 남아있다가 칩이 항온조 내 놓이게 되면 공기가 열팽창하여 기포가 형성되는 것으로 추측된다. 그리고 Fig. 6 (a)와 (b)에서 공통적으로 보이는 찌꺼기는 PDMS를 기계적 펀칭을 하고 난 후 생기는 미세 파편과 미세 먼지로 추측된다. 기포가 형성되는 문제점은 제작된 마이크로칩 내부에 친수성 코팅을 통해 해결할 수 있을 것이다. 그리고 미세 파편을 없애기 위해서는 좀 더 정교한 주입구/배출구 형성방법이 요구된다. 최종적으로, 아세틸콜린이 쥐 정자의 주화성을 유도하는 화학물질이며 이를 이용하여 활동성 있는 정자를 분리할 수 있음을 알 수가 있다.

5. 결론

운동성 있는 정자의 분리를 위한 마이크로칩을 설계하고 제작하였다. 제작된 마이크로채널 내에서 농도구배가 선형적으로 형성됨을 형광실험을 통하여 확인하였고 유도물질인 아세틸콜린과 대조군으로 사용된 탈이온수를 이용하여 쥐 정자가 채널 내에 형성된 농도 구배에 대하여 주화성 반응을 보이는 것을 확인하였다. 그리고 제작된 마이크로칩 상에서 쥐 정자를 이용하여 유도물질인 아세틸콜린의 농도에 따른 활동성 정자분리 실험을 수행한 결과 주화성을 일으키는 최적의 농도구배가 약 0.625 mg/ml/mm 임을 확인하였다. 제작된 마이크로칩은 배출구가 8개로 구성되어 있어 8가지 반응조건을 동시에 실험할 수

있다. 따라서 각각의 반응조건에 대해 개별적으로 실험하는 것보다 시간이 훨씬 단축되고 신뢰성이 있기 때문에 high throughput screening(HTS)이 가능할 수 있다. 또한 기존의 정자 분리칩에 비해 실린지 펌프와 같은 유동 형성장치가 필요하지가 않다. 마이크로 피펫을 이용하여 시료 일정량을 칩에 간단히 투입만 하면 채널 내에 길이방향으로 농도구배를 쉽게 형성시킬 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서 제안된 바이오칩은 체외수정을 위한 운동성 정자 분리법으로 유용하게 사용될 뿐만 아니라, 주화성을 이용한 세포 분리 분야에도 적용이 가능 할 것이다.

후 기

본 연구는 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KFR-2006-311-D00326)

참고문헌

- (1) Eisenbach, M. and Giojalas L. C., 2006, "Sperm Guidance in Mammals- an Unpaved Road to the Egg," *Nat. Rev. Mol. Cel Biol.*, Vol. 7, pp. 276~285.
- (2) Bahat, A. and Eisenbach, M., 2006, "Sperm Thermotaxis," *Mol. Cell. Endocrinol.*, Vol. 252, pp. 115~119.
- (3) Bahat, A., Eisenbach, M. and Tur-Kaspa, I., 2005, "Periovulatory Increase in Temperature Difference Within the Rabbit Oviduct," *Hum. Reprod.*, Vol. 20, No. 8, pp. 2118~2121.
- (4) Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Breitbart, H. and Eisenbach, M., 2003, "Thermotaxis of Mammalian Sperm Cells: A Potential Navigation Mechanism in the Female Genital Tract," *Nat. Med.*, Vol. 9, No. 2, pp. 149~150.
- (5) Eisenbach, M., 1999, "Sperm Chemotaxis," *Rev. Reprod.*, Vol. 4, pp. 56~66.
- (6) Ei-Toukhy, T. and Braude, P., 2002, "Male Infertility and ICSI," *Curr. Obstet. Gynaecol.*, Vol. 12, pp. 276~285.
- (7) Henkel, R. R. and Schill, W. B., 2003, "Sperm Preparation for ART," *Reprod. Biol. Endocrinol.* Vol. 2:12.;<http://www.rbej.com/content/2/1/12>
- (8) Horsman, K. M., Barker, S. L. R., Ferrance, J. P., Forrest, K. A., Koen, K. A. and Landers, J. P., 2005, "Separation of Sperm and Epithelial Cells in a Microfabricated Device: Potential Application to Forensic Analysis of Sexual Assault Evidence," *Anal. Chem.*, Vol. 77, No. 3, pp. 742~749.
- (9) Kricka, L. J., Faro, I., Heyner, S., Garside, W. T., Fitzpatrick, G., McKinnon, G., Ho, J. and Wilding, P.,

- 1997, "Micromachined Analytical Devices: Microchip for Semen Testing," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Vol. 15, pp. 1443~1447.
- (10) Cho, B. S., Schuster, T. G., Zhu, X., Chang, D., Smith, G. D. and Takayama, S., 2003, "Passively Driven Integrated Microfluidic System for Separation of Motile Sperm," *Anal. Chem.* Vol. 75, No. 7, pp. 1671~1675.
- (11) Clark, S. G., Haubert, K., Beebe, D. J., Ferguson, C. E. and Wheeler, M. B., 2005, "Reduction of Polyspermic Penetration Using Biomimetic Microfluidic Technology During in Vitro Fertilization," *Lab Chip*, Vol. 5, pp. 1229~1232.
- (12) Koyama, S., Amarie, D., Soini, H. A., Novotny, M. V. and Jacobson, S. C., 2006, "Chemotaxis Assay of Mouse Sperm on Microfluidic Devices," *Anal. Chem.*, Vol. 78, No. 10, pp. 3354~3359.
- (13) Brody, J. P., Yager, P., Goldstein, R. E. and Austin, R. H., 1996, "Biotechnology at Low Reynolds Numbers," *Biophys. J.*, pp. 3430~3441.