

## 다중 밸브를 이용한 디지털 희석 소자

이 동 우\* · 조 영 호\*†

\* KAIST 바이오및뇌공학과

### Digital Dilution Chip Based on Use of Selective Inter-well Valve Control

Dong Woo Lee\* and Young-Ho Cho\*†

\* Dept. of Bio and Brain Engineering, KAIST

(Received August 18, 2009 ; Revised January 25, 2010 ; Accepted February 24, 2010)

**Key Words** : Digital Dilution (디지털 소자), Inter-well Valve(경계밸브)

**초록**: 본 논문에서는 시료의 희석비를 조절할 수 있는 2×6 well 어레이 디지털 희석소자를 제안한다. 본 소자는 정해진 체적을 가지는 Well 의 경계면에 경계밸브(Inter-well Valve)를 설치하고, 이를 선택적으로 개폐하여 구조적 변경 없이 희석비를 조절할 수 있다. 제안된 희석소자는 희석비를 선형 또는 지수적으로 희석 오차 17% 이내에서 조절 할 수 있을 뿐만 아니라, 희석된 시료의 체적을 정확하게 제어하여 이중시료와 17.7% 오차 이내에서 희석된 시료를 반응시킬 수 있다.

**Abstract**: We present a digital dilution chip comprising a 2 × 6 array of wells; the chip can be employed to change the dilution ratio as well as to initiate reactions among diluted samples by using the inter-well valve around the well. In previous dilution devices, streams comprising sample and dilution solutions were merged and separated by a branched microchannel. Therefore, the dilution ratio could not be changed until the structure of the branched microchannel was changed. The present device merges and splits the wells filled with sample or dilution solution by controlling inter-well valves around the wells. Thus, it is possible to change the dilution ratio by changing the sequence in which merging and splitting sequence of each well filled with sample or dilution solution. In experiments, we found that the chip could be used to change linear or exponential dilution ratios within an error of 16.7% and to initiate reactions among the samples within a reaction error of 17.7%.

- 기호설명 -

- $W_1-W_{12}$  : 웰 (Well)
- $V_{il} \sim V_{is}$  : 유입 밸브 (Inlet Valve)
- $V_d$  : 희석 밸브 (Dilution Valve)
- $V_r$  : 반응 밸브 (Reaction Valve)
- $A_m$  : 혼합 구동기 (Mixing Actuator)

### 1. 서론

생화학 시료의 희석 또는 희석된 시료와 이중시료간의 반응은 생화학 실험에서 필수적인 과정이다. 이러한 필요성 때문에 희석과정을 빠르고 정확하게 할 수 있는 마이크로 희석 소자에 대한 연

구가 최근에 활발하게 진행되고 있다. 가장 대표적인 것은 가지 구조의 유로에 시료와 희석액을 동시에 흘려주어 희석하는 방식<sup>(1-6)</sup>이다. 하지만 이러한 방식은 시료와 희석액의 연속적인 흐름을 구조가 고정된 가지 유로를 이용하여 분리/혼합하므로 희석비 조절이 불가능하다. 또한 기존 방식은 시료의 희석을 위해 지속적인 유량 제어가 필요하고 희석된 시료의 정확한 체적 제어가 용이하지 않아 이중시료와 정확히 반응시키기 어려운 단점이 있다.

본 논문에서는 시료와 희석액을 정해진 체적의 웰에 선택적으로 채우고, 웰과 웰 사이의 경계밸브(Inter-well Valve)를 여닫아 웰 간 혼합/분리를 자유롭게 조절하여 시료를 사용자가 원하는 희석비로 희석할 수 있는 디지털 희석소자를 제안한다. 제안된 소자는 정해진 체적을 가지는 웰 내의

† Corresponding Author, nanosys@kaist.ac.kr

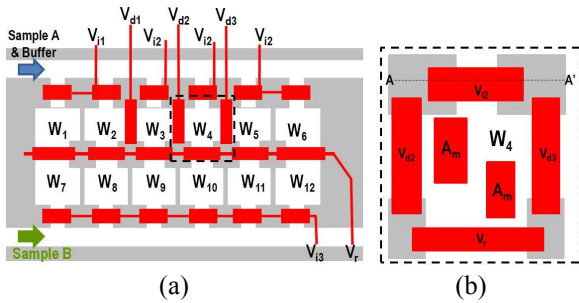


Fig. 1 Schematic view; (a) the digital dilution chip using the inter-well valves; (b)  $W_4$  well in (a) of dotted square, which contains mixing actuator( $A_m$ )

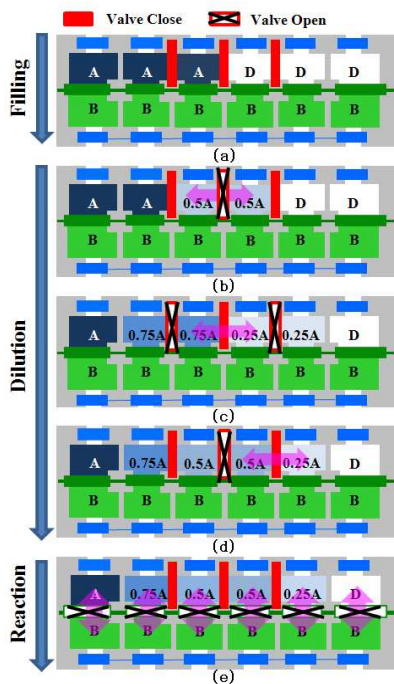


Fig. 2 Linear dilution and reaction procedure in the present chip; (a) selective filling of well with sample A, buffer D, and sample B; (b) dilution of  $W_3$ - $W_4$  well; (c) dilution of  $W_2$ - $W_3$  and  $W_4$ - $W_5$  well; (d) dilution of  $W_2$ - $W_3$  well; (e) reaction between upper and lower wells

시료를 희석하므로 정확한 유량제어가 필요 없고, 희석된 시료의 체적 제어가 용이하여 이중시료와 정확한 반응비로 쉽게 반응시킬 수 있다.

## 2. 본 론

### 2.1 작동원리

Fig. 1(a)는  $2 \times 6$  웰 어레이를 나타낸다. 상단부 6 개의 웰에서 원하는 희석비의 시료를 얻고, 희석된 시료는 하단부 6 개 웰의 반응액과 개별적으로 반응하게 된다. Fig. 1(b)는 4 번째 웰( $W_4$ )의 확대도이다. 웰의 사면에 경계밸브(Inter-well Valve)가 있

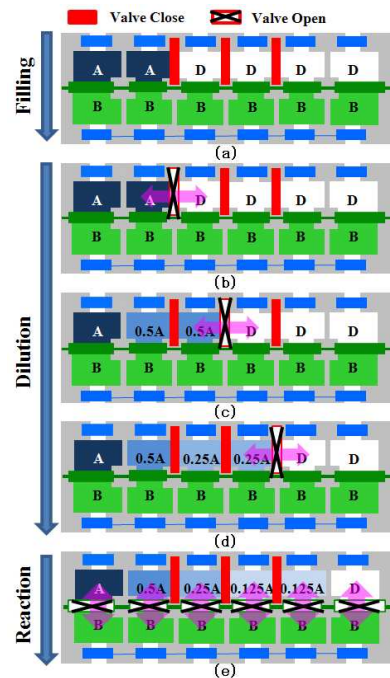


Fig. 3 Exponential dilution and reaction procedure in the present chip; (a) selective filling of well with sample A, buffer D, and sample B; (b) dilution of  $W_2$ - $W_3$  well; (c) dilution of  $W_3$ - $W_4$  well; (d) dilution of  $W_4$ - $W_5$  well; (e) reaction between upper and lower wells

고, 웰 상부의 중앙에 혼합을 위한 혼합 구동기(Mixing Actuator,  $A_m$ )가 있다. 경계밸브(Inter-well Valve)는 유체를 웰 안으로 선택적으로 주입하기 위한 주입밸브(Inlet valve,  $V_{i1}$ ,  $V_{i2}$ ,  $V_{i3}$ ), 시료를 옆 웰의 희석액과 혼합하여 희석시키는 희석밸브(Dilution valve,  $V_{d1}$ ,  $V_{d2}$ ,  $V_{d3}$ ), 그리고 희석된 시료와 반응액을 혼합시키는 반응밸브(Reaction valve,  $V_r$ )로 구성된다. 이때, M 혼합 구동기( $A_m$ )는 시료의 희석 및 반응과정에서 유체 혼합시간을 단축시키기 위해 사용된다.

작동과정은 먼저 주입밸브를 개방하여 시료와 희석액을 선택적으로 웰에 주입하는 주입단계(Filling), 희석밸브를 순차적으로 개방하여 시료와 희석액을 혼합하여 희석시키는 희석단계(Dilution), 그리고 상단부 웰의 희석된 시료와 하단부 웰의 반응액과 반응시키는 반응단계(Reaction) 등으로 나누어진다. 시료의 희석비는 상단부 웰에 각각 시료와 희석액을 채우는 조합과 희석밸브를 개방하는 순서에 따라서 선형(100%, 75%, 50%, 25%, 0%) 또는 지수(100%, 50%, 25%, 12.5%, 0%)적으로 조절된다.

선형적 희석의 경우, Fig. 2 와 같이 주입단계에서는  $W_1 \sim W_3$  웰에 시료(A)를,  $W_4 \sim W_6$  웰에 희석액

(D)를,  $W_7 \sim W_{12}$  웰에 반응액(B)를 선택적으로 주입한다. 희석단계에서는 Fig. 2(b)와 같이 두 번째 희석밸브( $V_{d2}$ )를 열어서  $W_3$  과  $W_4$  를 혼합하여 50%로 희석된 시료(0.5A)를 만든다. 그 다음 [Fig. 2(c)] 첫 번째와 세 번째 희석밸브( $V_{d1}$ ,  $V_{d3}$ )을 동시에 열어서 각각 75%와 25%로 희석된 시료들(0.75A, 0.25A)을 만든다. 마지막으로 다시 두 번째 희석밸브( $V_{d2}$ )를 열어서 0.75A 와 0.2A 시료를 혼합하여 0.5A 의 시료를 얻는다. 이상과 같은 순으로 희석밸브를 순차적으로 개폐하게 되면 상단부 6개 웰은 100%, 75%, 50%, 50%, 25%, 0%로 희석된 시료(A)로 채워진다. 이렇게 만들어진 희석된 시료는 반응밸브( $V_r$ )을 개방함으로써 하단부 6개의 반응액과 개별적으로 반응하게 된다. 이상의 주입, 희석, 반응단계를 거쳐서 샘플(A)는  $W_2$ 에서  $W_5$ 까지 선형적 희석비로 희석되고, 이 희석된 샘플이 반응액(B)과 개별적으로 반응하게 된다.

지수적 희석의 경우, Fig. 3 와 같이 주입단계에서는  $W_1 \sim W_2$  Well 에 시료(A)를,  $W_3 \sim W_6$  Well 에 희석액(D)를,  $W_7 \sim W_{12}$  Well 에 반응액(B)를 선택적으로 주입한다. 희석단계에서는 순차적으로 희석밸브( $V_{d1}$ ,  $V_{d2}$ ,  $V_{d3}$ )를 열어서  $W_2 \sim W_3$ ,  $W_3 \sim W_4$ ,  $W_4 \sim W_5$  웰을 순차적으로 혼합하여 시료(A)를 순차적으로 반씩 희석한다. 마지막으로 반응단계에서는 반응밸브( $V_r$ )를 열어서 상단부 6개 웰과 하단부 6개 웰을 동시에 반응시킨다. 이상의 주입, 희석 반응 단계를 거쳐서 샘플(A)는  $W_2$ 에서  $W_5$ 까지 순차적으로 반씩 희석되고, 이 희석된 샘플이 반응액(B)와 동시에 반응하게 된다.

2.2 설계 및 제작

$2 \times 6$  웰 어레이의 웰은 폭  $400\mu\text{m}$ , 길이  $400\mu\text{m}$ , 높이  $15\mu\text{m}$  로 설계하여 2.4nl 의 체적을 가진다. 그리고 Fig. 1(b)에 나타난 경계밸브들과 혼합구동기는 Table 1 과 같이 설계하였고, 실험적으로 경계밸브의 닫히는 압력은 약 10kPa 내외로 측정되었다. 본 실험에서는 50kPa 의 압력으로 경계밸브를 작동시켰고, 혼합과정에서는 폭  $200\mu\text{m}$ , 길이  $400\mu\text{m}$  의 박막을 가진 혼합구동기( $A_m$ )를 50kPa 압력에서 2Hz 의 진동으로 교반을 촉진시켜 1분 이내로 하였다.

제안된 소자는 PDMS 을 이용한 몰딩 공정으로 만든 두 개의 유로층을  $20\mu\text{m}$  두께의 PDMS 박막과 접합하여 제작하였다.  $20\mu\text{m}$  두께의 PDMS 박막은 실리콘 기판 위에 PDMS 를 10mL 넣고 4000rpm 으로 30 초간 스펀코팅하여 제작하였다.

Table 1 Measured characteristics of the inter-well valves

	Size (width × length)	Closing pressure
Inlet Valve( $V_i$ )	$200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$	$15 \pm 5\text{ kPa}$
Dilution Valve( $V_d$ )	$200\mu\text{m} \times 325\mu\text{m}$	$10 \pm 5\text{ kPa}$
Reaction Valve( $V_r$ )	$400\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$	$10 \pm 5\text{ kPa}$

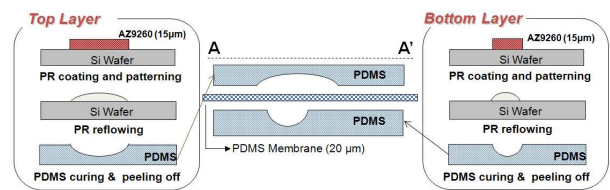


Fig. 4 Fabrication process of the cross section along A-A' in Fig. 1(b)

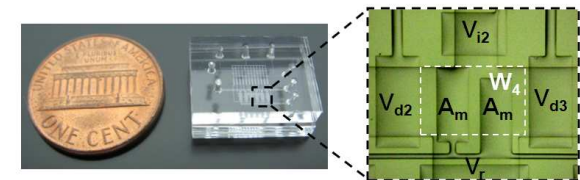


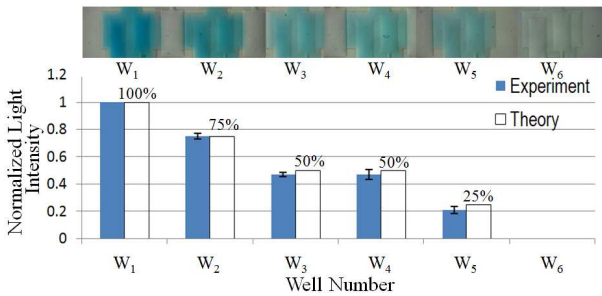
Fig. 5 Fabricated digital dilution chip. Enlarge view is  $W_4$  Containing inlet-, dilution- and reaction-valves

Fig. 4 는 Fig. 1(b)의 A-A' 단면을 기준으로 한 공정도를 나타낸다. 압력을 전달하는 상판은 AZ9260 PR(Photo Resist)를 이용하여  $15\mu\text{m}$  단차의 몰더를 만들고 이를 이용하여 PDMS 유로를 만들었다. 유체층(Fluidic layer) 또한 AZ9260 PR 로  $15\mu\text{m}$  단차의 몰더를 만들었다. 두 층 모두 박막이 휘어서 유로를 완전히 막기 위해서 단면이 사각형 모양인 몰더를 Reflowing ( $120^\circ\text{C}$ 에서 5 시간 열처리)이라는 과정을 통해서 원형 단면의 몰더를 만들고 이를 이용해 원형단면의 PDMS 유로를 제작하였다. 마지막으로 제작된 상하판을  $20\mu\text{m}$  PDMS 박막과 함께 정렬하고 접합하여 Fig. 4 와 같이  $2 \times 6$  웰 어레이를 제작하였다

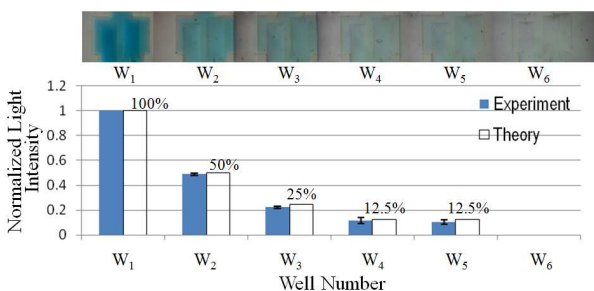
2.3 실험 및 결과

실험에서는 시료(A)로 Methylene Blue 시약을, 반응액(B)와 희석액(D)은 DI water 를 사용하였다. 그리고 희석과 반응 과정 후의 Methylene Blue 시약의 상대적인 명암도 (Normalized Light Intensity) 를 측정하여 제안된 소자의 희석과 반응 성능을 정량적으로 분석하였다.

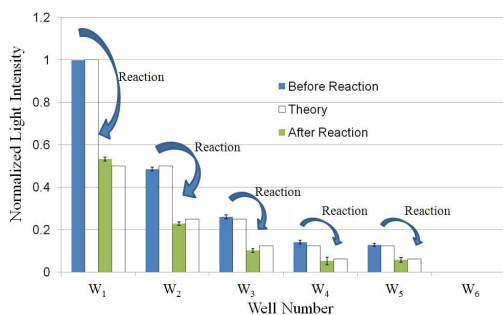
Fig. 6 은 Fig. 2 와 같은 선형적 희석비로 희석한 결과를 보여준다.  $W_1$  과  $W_6$  웰의 명암을 각각 1 과



**Fig. 6** Linear dilution results of Fig. 2. Photograph shows wells filled with the exponentially-diluted Methylene Blues. Graph shows the normalized light intensity from the center of each well



**Fig. 7** Exponential dilution results of Fig. 3. Photograph shows wells filled with the exponentially-diluted Methylene Blues. Graph shows the normalized light intensity from the center of each well



**Fig. 8** Reaction results; after reacting upper wells of Fig. 6 with DI water in lower wells, the light intensities of each well of Fig. 3(e) are reduced in the half

0 로 설정하고 나머지 웰의 희석 정도를 상대적 명암도로 정량화 해 본 결과, 희석비가 74.7%, 46.7%, 20.8%로 선형비로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이때 최대 희석 오차는 16.7% 이었다.

Fig. 7 은 Fig. 3 과 같은 지수적 희석비로 희석한 결과를 보여준다. W<sub>1</sub> 과 W<sub>6</sub> 웰의 명암을 각각 1 과 0 로 설정하고 나머지 웰의 희석 정도를 상대적 명암도로 정량화 해 본 결과, 각 단계를 거칠 때 마다 W<sub>2</sub> 에서 W<sub>5</sub> Well 의 농도가 반씩 줄어들어 48.8%, 22.3%, 11.4%로 지수비로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이때 최대 희석 오차는 16%이었다. 반응실험에서는 희석된 상위 웰(W<sub>1</sub>~W<sub>6</sub>)의 샘플

플들을 다시 DI water 로 채워진 하위 웰(W<sub>7</sub>~W<sub>12</sub>) 과 동시에 반응 시, 상단부 각 웰의 농도가 반으로 떨어졌으며, 반응 오차는 17.7% 이었다(Fig. 8). 희석 및 반응 웰의 단면이 밸브 구동을 위해 원형으로 만들어져서 Light Intensity 의 측정오차가 크게 나타나 희석 및 반응 오차가 15-17%로 크게 측정되었다. 향후 밸브를 제외한 유로 및 웰의 단면을 사각형 형태로 제작하여 Light Intensity 측정의 개선이 필요하다.

### 3. 결론

본 논문에서는 정해진 체적을 가지는 Well 의 경계면에 경계밸브(Inter-wellVavle)를 설치하고, 이를 선택적으로 개폐하여 구조적 변경 없이 희석비를 조절할 수 있는 희석소자를 설계/제작하고 이를 실험적으로 검증하였다. 제안된 희석소자는 희석비를 선형 또는 지수적으로 희석 오차 17% 이내에서 조절 할 수 있을 뿐만 아니라, 희석된 시료의 체적을 정확하게 제어하여 이중시료와 17.7% 오차 이내에서 희석된 시료를 반응시킬 수 있다.

### 후 기

본 연구는 과학기술부의 창의적연구진흥사업의 일환인 "생체모사기법을 응용한 디지털나노구동기관의 구현에 관한 연구" 과제의 지원으로 수행되었습니다.

### 참고문헌

- (1) Dertinger, S. K. W., Chiu, D. T., Jeon, N. L. and Whiteside, G. M., 2001, "Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks," *Anal. Chem.* Vol.73, 1240~1246.
- (2) Walker, G. M., Riviere, N. M., Rouse, J. and Neill, T. O., 2007, "A linear dilution microfluidic device for cytotoxicity assays," *Lab on a Chip*, Vol. 7, 226~232.
- (3) Yamada, M., Hirano, T., Yasuda, M. and Seki, M., 2006, "A Microfluidic Flow Distributor Generating Stepwise Concentrations For High-throughput Biochemical Processing," *Lab on a chip*, Vol.6, 179~184.
- (4) Bang, H., Lim, S. H., Lee, Y. K., Chung, S., Chung, C., Han, D. -C. and Chang, J. K., 2004, "Serial Dilution Microchip For Cytotoxicity Test," *J. Micromech. Microeng.*, Vol.14, 1165~1170.
- (5) Kim, C., Lee, K., Kim, J. H., Shin, K. S., Lee, K. -J.,

Kim, T. S. and Kang, J. Y., 2008, "A Serial Dilution Microfluidic Device using A Ladder Network Generating Logarithmic or Linear Concentrations," Lab on a chip, Vol.8, 473~479.

(6) Hansen, C. L., Skordalakes, E., Berger, J. M. and

Quake, S. R., 2002, " A Robust and Scalable Microfluidic Metering Method That Allows Protein Crystal Growth By Free Interface Diffusion," PNAS Vol.99, 16531~16536.