

미세유체시스템을 이용한 예쁜꼬마선충의 물리적 자극에 대한 반응 분석

윤선희* · 박혜령** · 전태준*⁺ · 김선민**⁺

Analysis of responses to physical stimuli in *Caenorhabditis elegans* using a microfluidic system

Sunhee Yoon, Hailing Piao, Tae-Joon Jeon and Sun Min Kim

Abstract

Abstract. *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) has various interesting behavioral properties, such as chemotaxis, thermotaxis, and electrotaxis. However, most previous research were only focused on single-stimulus for studying its behavioral properties. In this paper, we propose a simple and effective device for analyzing the behavior of *C.elegans* with combined stimuli, electric field and temperature. We compared and analyzed wild type worms (N2) and four mutant worms (*tax-4*, *tax-7*, *unc-54*, *unc-6*). We analyzed the reaction of worms to certain stimulus and identified that this device is effective to apply a combined stimulus.

Key Words : *Caenorhabditis elegans* (예쁜꼬마선충), thermotaxis(온도주성), electrotaxis(전기주성)

1. 서론

생명과학, 공학 분야에서 모델생물체로 널리 연구되고 있는 예쁜꼬마선충은 다세포 생물 중 최초로 게놈이 모두 해독된 동물로서 몸체가 투명하고, 현미경으로 용이하게 관찰 가능하며 세대주기가 짧아 신속하게 실험 결과를 얻을 수 있다는 장점을 가진다.¹⁾ 가장 큰 특성은 인간과 60~80%의 유전자를 공유하고 있다는 점이다.²⁾ 최근, 전 세계적으로 동물 실험 기반의 검증 시스템에 대한 요구는 높아지고 있으나 윤리적인 문제가 대두되어 점차 동물 실험에 대한 규제가 강화되고 있다. 이러한 시점에서 비교적 윤리적 문제를 수반하지 않으면서 인간과 상동한 유전자가 많이 보존된 예쁜꼬마선충은 모델 동물로서의 가치가 수직 상승하고 있다. 따라서 세계 곳곳에서 예쁜꼬마선충

을 모델생물체로 한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

특히 예쁜꼬마선충을 이용하여 돌연변이 개체와 야생형 개체의 차이점을 통해 특정 유전자의 기능을 분석하고 밝혀낼 수 있기 때문에 현재 예쁜꼬마선충의 돌연변이 개체를 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

이러한 연구는 주로 자극을 인가하고 그 자극에 대한 반응을 분석하는 시스템에서 진행되는데, 이전의 많은 선행 연구들은 단일 자극에만 초점을 맞추어 실험을 진행하였다.^{3), 4), 5)} 이는 실제 생물체가 살아가는 복합적인 자극이 동시에 인가되는 환경을 충분히 모사하지 못하므로 그 결과를 얻는데 분명한 한계점이 있다.

본 연구에서는 다양한 물리적 자극(온도자극 및 전기자극)에 초점을 맞추어 복합적 자극을 인가할 수 있는 시스템을 제작하여 예쁜꼬마선충의 야생형과 돌연변이 개체의 물리적 자극에 대한 반응을 분석하였다. 본 연구에서는 초

⁺ Sun Min Kim: Department of Mechanical Engineering, Inha University
E-mail : sunmk@inha.ac.kr

⁺ Tae-Joon Jeon: Department of Biological Engineering, Inha University
E-mail : tjjeon@inha.ac.kr

* 인하대학교 생명공학과

** 인하대학교 기계공학과

기 연구로 온도 자극과 전기 자극을 우선적으로 인가하여 선충의 반응을 분석하였으며, 야생형과 각각의 자극에 대하여 정상적인 반응을 나타내지 않는 돌연변이 개체의 실험을 수행하여 비교, 분석하였다. 이와 같은 일련의 실험을 통해 본 연구에서 개발된 시스템을 이용하여 충분히 효과적으로 서로 다른 두 가지의 자극을 인가하고 그에 대한 반응을 분석할 수 있음을 보였다.

본 연구에서 개발된 시스템은 다음과 같은 장점이 있다. 첫 번째로, 시스템의 구성이 매우 간단하다. 간단한 구성으로도 예쁜꼬마선충의 반응을 효과적으로 분석할 수 있다. 두 번째로 반응을 분석할 때 일반적으로 쓰이는 생화학적인 물질을 사용하지 않으므로 예쁜꼬마선충이 물리적 자극 외에는 다른 영향을 받지 않는다. 마지막으로 본 시스템에서 두 가지 물리적 자극을 효과적으로 인가하였으므로 향후 다른 자극을 인가할 수 있는 플랫폼으로 응용이 가능함을 검증하였다.

2. 실험방법

2.1 예쁜꼬마선충의 배양

실험에 사용된 예쁜꼬마선충은 N2(야생형), PR678 (*tax-4*)⁷, IK589(*txx-7*)⁸, CB78(*unc-6*)⁹, BC347 (*unc-54*)¹⁰, 총 5 종류로 CGC (Caenorhabditis Genetics Center)에서 구매하여 실험실 인큐베이터에서 15°C 및 20°C에서 배양하였다. 배양 시에는 일반적인 프로토콜에 따라 제작된 NGM(nematode growth media)배지를 사용하였다. 이렇게 배양된 예쁜꼬마선충은 egg preparation을 거쳐 같은 나이, 같은 크기로 키우게 된다. 이 과정을 synchronization이라고 하며 이 과정을 거쳐서 자란 예쁜꼬마선충으로 실험을 진행하였다. 이는 예쁜꼬마선충이 stage에 따라 신경 발달 정도가 다르므로 신뢰도 높은 결과를 얻기 위해 반드시 필요한 과정이다.

2.2 물리적 자극에 대한 반응분석용 미세유체시스템 제작

예쁜꼬마선충의 물리적 자극에 대한 반응을 분석하기 위한 미세유체시스템은 soft-lithography 공정으로 제작하였다. silicon wafer위에 패턴이 있는 몰드(mold)를 제작하고 몰드 위에 생체 적합 물질인 PDMS(polydimethylsiloxane)를 응고시켜 패턴이 찍힌 PDMS 디바이스를 제작하였다. 최종적인 미세유체시스템은 PDMS 디바이스를 플라즈마 공정을 통해 slide glass와 접합하여 제작하였다. 실제 제작된 채널의 규격은 전체 길이 1 cm, 폭 300 μm, 높이 100 μm

이며, 전기장을 인가하기 위한 부속채널의 폭은 25 μm이다. 또한 전극을 삽입하기 위한 각 부속 채널 간의 간격은 2 mm이며 최대 8개의 전극을 동시에 삽입할 수 있도록 하였다. 전체적인 디바이스의 크기는 슬라이드 글라스 크기로 맞추어 제작되었다.

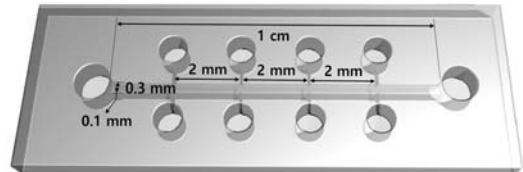


Fig. 1. Experiment device scale

2.3 예쁜꼬마선충의 온도주성 비교실험

2.3.1 온도구배시스템 제작

온도구배시스템은 펠티어 소자(LAIRD TECHNOLOGES, 12*12*3.6mm)로 제작하였다. 펠티어 소자는 펠티어 원리에 근거한 것으로 한 면은 발열하고 다른 한 면은 흡열하게 된다. 열포화가 일어나면 표면 온도가 일정하게 유지되지 않으므로 펠티어 소자에 방열판을 붙여 열포화가 일어나지 않게 하여 표면 온도를 유지하였다. 한쪽은 13.5°C (인가전압 1.8V), 다른 한쪽은 20°C(인가전압 0.4V)를 만들어 유지시키고 그 위에 미세유체시스템을 놓았을 때 약 5분 뒤 정상상태에 도달하고 칩 표면에 선형적인 온도구배가 생기는 것을 확인하였다.

2.3.2 예쁜꼬마선충의 종류에 따른 온도주성 비교실험

Egg preparation 과정을 통해 같은 세대로 배양된 예쁜꼬마선충을 준비하였다. 제작된 미세유체시스템을 플라즈마 처리를 통해 표면이 친수성을 띠게 하고 M9 buffer를 주입하였다. 다음으로 준비된 예쁜꼬마선충 20~30마리를 미세유체시스템에 넣었다. 각 종류의 예쁜꼬마선충을 각각 다른 미세유체시스템에 넣고 표면에 명칭을 주기하였다. 이때 온도구배시스템을 작동시키고 온도구배시스템의 양끝단의 온도(두 펠티어 소자 표면의 온도)가 13.5°C, 20°C에서 안정화되면 미세유체시스템을 올려놓았다. 현미경으로 실시간으로 예쁜꼬마선충의 움직임을 촬영하고 이미징 소프트웨어를 이용하여 비디오로 기록하였다. 각 종류의 예쁜꼬마선충으로 5세트의 실험을 진행하며 각 세트의 실험은 온도구배를 가하고 20분간 기록을 하는 것으로 진행하였다.

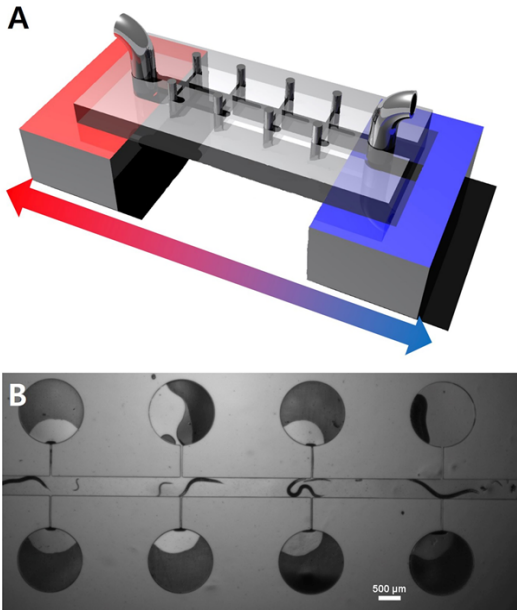


Fig. 2. (A) Thermotaxis experiment device, (B) The actual appearance of the worm in the channel

2.4 예쁜꼬마선충의 전기주성 비교실험

2.4.1 전기장인가 시스템 구성

채널에 전기장을 인가하기 위하여 염화은(AgCl) 전극을 제작하여 부속채널에 삽입하여 고정하였다. 이를 이용하여 채널에 고르게 전기장을 인가하기 위하여 KEITHLEY 6478 picoammeter/voltage source를 사용하였다. 선행연구에서 예쁜꼬마선충이 반응한다고 검증된 4V/cm 세기의 전기장을 고르게 인가하였으며, 매 실험 세트마다 전압을 측정하여 검증하고 실험을 수행하였다.

2.4.2 예쁜꼬마선충의 종류에 따른 전기주성 비교실험

온도주성 실험과 동일하게 egg preparation 과정을 거쳐 동일한 세대로 배양된 예쁜꼬마선충을 사용하였다. 준비된 예쁜꼬마선충을 미세유체시스템에 주입하고 부속채널에 삽입된 전극에 전압을 인가하여 전기장을 형성하였다. 이 때 형성되는 전기장은 채널을 크게 세 부분으로 나누었을 때(zone A, B, C) A와 C 구역에만 형성된다. 전기장의 방향은 가운데 구역인 B 구역을 향하도록 하였으며, 전기장을 인가하기 전 분포와 전기장을 인가한 후 1분 간격으로 전체 마리 수에 대한 각 구역의 선충의 비를 계산하여 전기주성 결과를 분석하였다. 최소 10세트의 실험을 수행하여 평균 분포 비율을 얻었다. 전기장에 대한 야생형과 돌연변이 개체의 반응을 비교, 분석하기 위하여 전기주성

결함 돌연변이(*unc-6*)와 속도가 느린 근육 결함 돌연변이(*unc-54*)를 이용한 실험도 수행하였다.

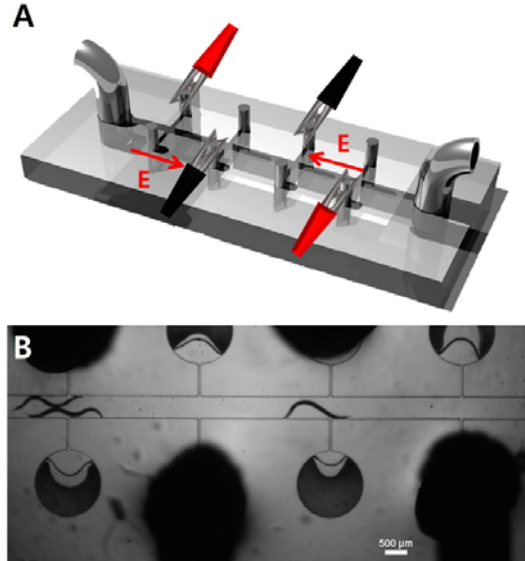


Fig. 3. (A) Electrotaxis experiment device, (B) The actual appearance of the worm in the channel with electrode

3. 결과 및 분석

3.1 온도주성 비교실험 결과

온도주성 비교실험에서 펠티어 소자를 이용하여 13.5 - 20.0°C의 온도구배를 제작하였다. 해당 온도는 열전대를 이용하여 측정하였고, 온도구배는 선형으로 가정할 수 있었다. 낮은 온도인 13.5°C에서부터 같은 간격으로 A, B, C, D 구역으로 나누어 시간에 따른 예쁜꼬마선충의 분포 정도를 분석하였다. 실험에 사용한 예쁜꼬마선충은 YA(예쁜꼬마선충의 일생 중 Young Adult 시기)이고 해당 예쁜꼬마선충은 15°C에서 배양하였다.

따라서 온도주성에 따르면 시간이 지남에 따라 예쁜꼬마선충은 배양된 온도인 15°C 부근에 많이 분포되어야 한다. 디바이스에 위에서 설명한 바와 같은 온도구배를 조성하고, 15°C에서 배양한 예쁜꼬마선충을 유입하였을 때 결과는 Fig.4에 나타내었다. 야생형의 경우, 배양된 온도인 15°C 근처에 주로 분포되는 것을 확인하였다. 온도 주성 결함 돌연변이인 *tax-4*, *ttx-7*의 경우는 상대적으로 고르게 분포하며 야생형과 다른 양상을 나타낸다. 따라서 이 두 돌연변이는 비정상적인 온도주성을 가지는 것을 알 수 있

다. 본 실험을 통해 예쁜꼬마선충의 야생형과 돌연변이 개체가 서로 다른 온도주성을 나타낸다는 것을 알 수 있으며 이 미세유체시스템이 예쁜꼬마선충의 온도주성을 쉽게 비교분석 할 수 있음을 검증하였다.

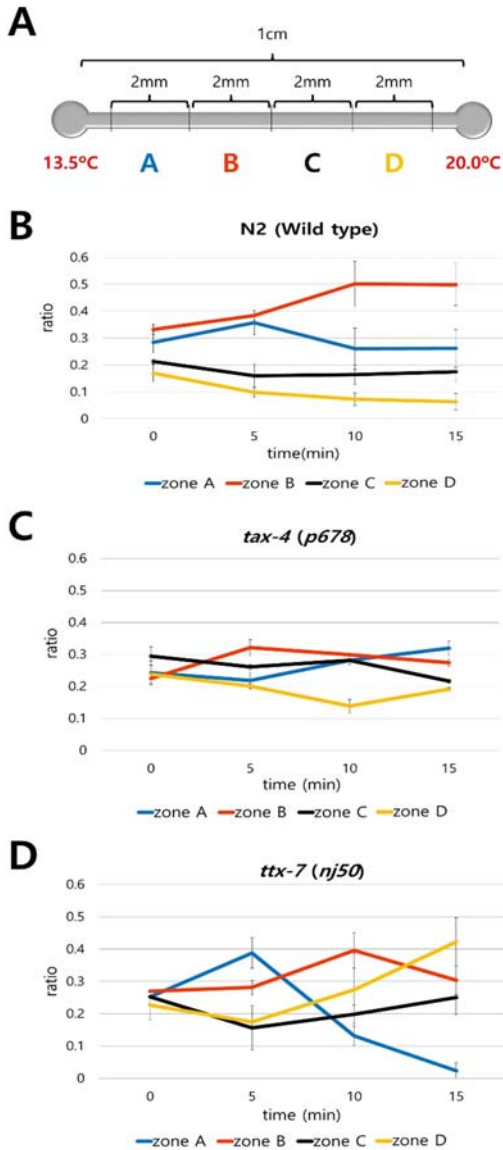


Fig. 4. (A) The device used for a thermotaxis comparative experiment is divided into four zones to classify the location of the worms. (B-D) The graphs show the fraction of worms in each zone as a function of the experimental time. Three strains of worms: N2, *tax-4*, and *ttx-7* were compared to examine the difference between wilde type and mutant worms.

3.2 전기주성 비교실험 결과

선행연구결과에 따라 L4(예쁜꼬마선충의 일생 중 Larva 4단계 시기)-YA가 반응을 보이는 세기인 약 4V/cm의 전기장을 인가하였다. 마이크로 채널에 전극을 기준으로 왼쪽부터 순서대로 A, B, C 구역으로 나누었고(Fig.5 A) A와 C 구역으로부터 B구역 방향으로 전기장을 조성하였다. 정상적인 선충은 전기장 하에서 전기장의 방향을 따라 움직이는 전기 주성을 나타낸다. 따라서 야생형 선충의 경우, 채널에 전기장이 형성되면 시간이 지남에 따라 선충들이 채널 양 끝에서부터 A와 C구역에 형성된 전기장을 감지하고 B 구역으로 모이게 될 것이다. 본 연구진은 이와 같은 양상을 “trap”이라는 개념으로 설정하였다. 반대로 전기 주성에 대해 결함을 나타내는 돌연변이 개체인 *unc-6*은 전기장을 따라 움직이지 못하므로 야생형 개체에 비해 상대적으로 자유롭게 전 채널에 분포하여 방향성 및 일관적인 반응을 나타내지 않을 것으로 추측하였다. 본 연구에서는 이와 같은 집단의 행동 양상을 한 번에 확인할 수 있는 단순한 시스템을 구현하였다. 본 연구에서 개발한 전기 주성 인가 미세유체시스템을 이용한 실험 결과는 Fig.5에 나타내었다. 야생형의 경우, 전기주성을 나타내어 상대적으로 단시간인 1분이 지난 후 B구역에 주로 분포하였다(Fig.5 B). 근육 결함 돌연변이인 *unc-54*의 경우 야생형에 비하여 상대적으로 이동 속도가 느리지만 전기 주성은 정상적으로 나타내는 것을 확인하였다(Fig.5 C). 약 5분 지난 후, 야생형과 마찬가지로 B구역에 주로 분포함을 알 수 있었다. B구역으로 느리게 집중되는 근육결함 돌연변이도 전기 주성을 나타낼 수 있도록 시스템이 충분히 긴 시간동안 전기장이 안정적으로 유지하는 것을 검증하였다. 마지막으로 전기주성 결함 돌연변이인 *unc-6*의 경우, 전기주성을 나타내는 다른 개체와는 달리 눈에 띄는 경향을 나타내지 않으며(Fig.5 D), 결과적으로 전 채널에 고르게 분포함을 알 수 있었다. 본 실험을 통해 예쁜꼬마선충의 야생형과 돌연변이 개체가 전기자극에 대해 서로 다른 반응을 나타냄을 검증하였으며, 본 미세유체시스템이 예쁜꼬마선충의 온도주성 뿐만이 아니라 전기주성을 효과적으로 검증할 수 있음을 보였다.

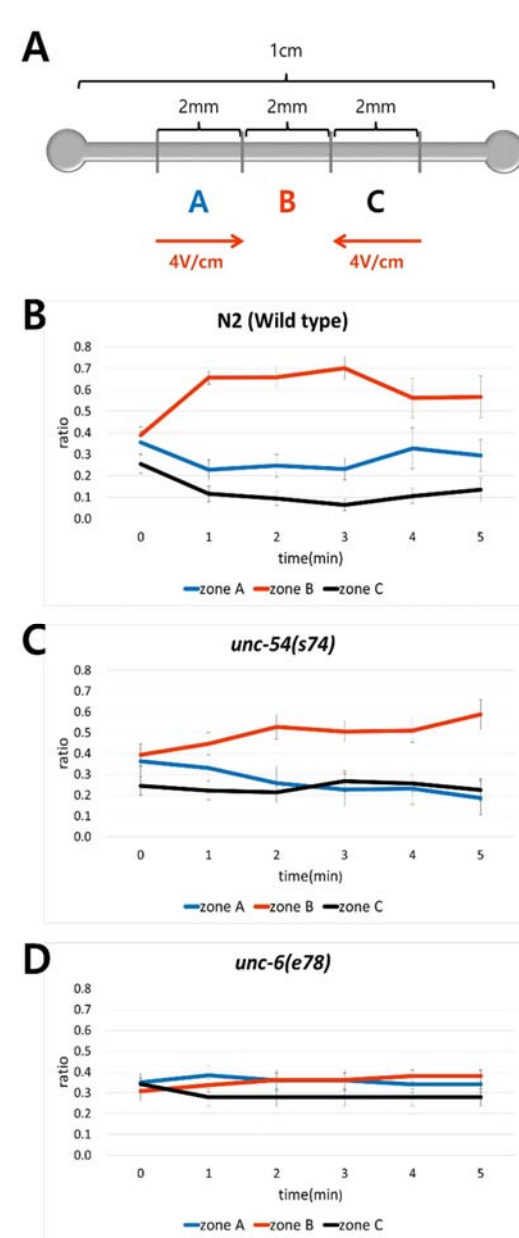


Fig. 5. (A) The device used for a electro taxis comparative experiment is divided into three zones to classify the location of the worms. (B-D) The graphs show the fraction of worms in each zone as a function of the experimental time. Three strains of worms: N2, *unc-54*, and *unc-6* were compared to examine the difference between wilde type and mutant worms.

4. 결 론

본 연구에서는 물리적 자극을 인가할 수 있는 미세유체 시스템을 구성하여 예쁜꼬마선충에 온도와 전기장 두 가지 자극을 각각 인가하고, 이러한 자극에 대한 야생형, 돌연변이 예쁜꼬마선충의 반응을 비교, 분석하였다. 실험 결과로부터 본 시스템이 예쁜꼬마선충의 물리적 자극에 대한 행동 분석에 적합한 효율적인 시스템이라는 것을 검증하였다. 본 시스템은 매우 간단하고 다른 시스템과의 결합이 용이하다. 따라서 하나의 자극에 국한되지 않고 본 시스템을 플랫폼으로 이용하여 다른 물리적 자극뿐만 아니라 화학적 자극에 대한 실험을 수행할 수 있다. 본 시스템에 화학적 농도 구배를 형성할 수 있는 채널을 추가적으로 구성한 후에 전기장 인가 또는 온도 구배를 형성하여 동일한 실험을 수행할 수 있다. 간단하게 효과적으로 미세채널을 구축하여 화학물질의 농도 구배를 형성할 수 있음을 보인 선행연구를 기반으로 이것을 응용하면 이와 같은 연구를 통해서 물리적 자극과 화학적 자극이 결합되었을 경우의 예쁜꼬마선충의 행동 변화 분석을 진행할 수 있는 초석을 다질 수 있다. 따라서 본 연구에서 개발한 예쁜꼬마선충의 행동 특성을 분석할 수 있는 플랫폼은 다양한 기초 연구에 응용될 수 있으며 더 나아가 단일 자극을 동시에 인가하는 실제 환경을 모사한 복합자극에 대한 연구로 발전할 수 있다. 인간을 비롯한 모든 생물체는 항상 다양하고 복잡한 자극에 노출되고 있으므로 인간과 많은 부분의 유전자를 공유하고 있는 예쁜꼬마선충에 대한 연구를 단일 자극분석으로부터 복합적 자극분석으로 확장하면 인간의 자극과 반응에 대한 보다 심도 깊은 이해가 가능할 것으로 기대된다.

후 기

이 논문은 정부의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(NRF-2013R1A1A2008983, NRF-2011-0022129)으로부터 지원받아 수행되었습니다.

REFERENCE

- 1) S. Brenner, "The Genetics of *Caenorhabditis elegans*". *Genetics*, 77 (1): 71-94, 1974.
- 2) Titus Kaletta1, Michael O. Hengartner, "Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model

- organism”, *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 387-399, 2006.
- 3) Pouya Rezaei, Asad Siddiqui, Ponnambalam Ravi Selvaganapathy and Bhagwati P. Gupta, “Electrotaxis of *Caenorhabditis elegans* in a microfluidic environment”, *Lab Chip*, 10, pp. 220~226, 2010.
 - 4) Tsubasa Kimata, Hiroyuki Sasakura, Noriyuki Ohnishi, Nana Nishio and Ikue Mori., “Thermotaxis of *C. elegans* as a model for temperature perception, neural information processing and neural plasticity”, *Worm*, 1(1), pp. 31~41, 2012.
 - 5) Han, B., Kim, D., Ko, U. H., & Shin, J. H., A sorting strategy for *C. elegans* based on size-dependent motility and electrotaxis in a micro-structured channel. *Lab Chip*, 12, 4128-34, 2012.
 - 6) Wang, Z., I. Lee, T. J. Jeon and S. M. Kim, "Micro-/Nanofluidic Device for Tunable Generation of a Concentration Gradient: Application to *Caenorhabditis Elegans* Chemotaxis." *Anal Bioanal Chem* 406, no. 11 : 2679-86, 2014.
 - 7) Jurado, P., E. Kodama, Y. Tanizawa and I. Mori. "Distinct Thermal Migration Behaviors in Response to Different Thermal Gradients in *Caenorhabditis Elegans*." *Genes Brain and Behavior* 9, no. 1, 120-127, 2010.
 - 8) Tanizawa, Y., A. Kuhara, H. Inada, E. Kodama, T. Mizuno and I. Mori. "Inositol Monophosphatase Regulates Localization of Synaptic Components and Behavior in the Mature Nervous System of *C-Elegans*." *Genes & Development* 20, no. 23, 3296-3310, 2006.
 - 9) Xu, Z., Li, H., & Wadsworth, W. G., "The roles of multiple UNC-40 (DCC) receptor-mediated signals in determining neuronal asymmetry induced by the UNC-6 (netrin) ligand." *Genetics*, 183, 941-9, 2009.
 - 10) Dibb, N. J., Brown, D. M., Karn, J., Moerman, D. G., Bolten, S. L., & Waterston, R. H., "Sequence analysis of mutations that affect the synthesis, assembly and enzymatic activity of the unc-54 myosin heavy chain of *Caenorhabditis elegans*." *J Mol Biol*, 183, 543-51, 1985.