

액적기반 미세유체장치에서 라이소자임 결정화

고관영 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
305-764 대전시 유성구 궁동 220
(2013년 8월 8일 접수, 2013년 10월 1일 수정본 접수, 2013년 10월 9일 채택)

Lysozyme Crystallization in Droplet-based Microfluidic Device

Kwan-Young Ko and In-Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 8 August 2013; Received in revised form 1 October 2013; accepted 9 October 2013)

요 약

액적기반 미세유체 시스템을 이용해 난백단백질인 라이소자임의 결정화실험을 하였다. Flow-focusing 칩을 이용해 water-in-oil 형태의 액적을 만들고 페트리 디쉬와 십자몰드에 넣은 후, 액적 내부에서 라이소자임 수용액과 침전제 (NaCl) 사이의 액-액 반응을 관찰하였다. 그리고 수용액의 pH가 4.8일 때와 7.2일 때의 결정형태를 비교하였다. 그 결과, pH 4.8에서는 다면체 또는 판상형의 결정이 형성되었고, pH 7.2에서는 침상형 결정이 생성되었다. pH 4.8, 7.2 두 경우 액적이 홀로 있을 때에는 액적부피가 유지되거나 감소하면서 결정이 형성되었다. 하지만 액적이 서로 인접해 있을 때는 액적사이의 상호작용이 관찰되었고, 두 pH에서 다른 경향성을 보였다. pH 4.8에서는 인접한 액적의 부피에 영향을 주어 한 액적의 부피가 커졌고, 부피가 커진 액적에서 결정이 형성되었다. pH 7.2에서는 부피에 영향을 서로 주지 않고 각각의 액적에서 결정이 형성되었다.

Abstract – Lysozyme crystallization was performed by using flow-focusing chip in droplet-based microfluidic system. Water-in-oil droplets were formed in the system and collected on petri-dish and cross type mold. Liquid-liquid reaction of lysozyme and sodium chloride occurred in the droplet and crystals were observed through microscope. Solution pH was varied as 4.8 and 7.2. Crystals of polyhedron and plate-like shape were obtained at pH 4.8, while needle structure crystals formed at pH 7.2. Lysozyme in single droplet for two pHs were crystallized with constant or decreased droplet size. However, crystals at pH 4.8 were only obtained in the droplet of which size was increased by the interaction between droplets. Droplet volume did not change at pH 7.2 and crystals formed in both droplets.

Key words: Microfluidic System, Droplet, Lysozyme, Protein Crystallization

1. 서 론

단백질결정화(protein crystallization)의 목적은 결정의 형태를 통해 3차원적 구조를 밝혀 구조와 기능의 연관성을 밝히는 데 있다. 이를 주로 연구하는 학문인 구조 단백질체학(structural proteomics)은 생체 내에서 직접 기능을 수행하는 단백질의 구조를 통해 기능과 현상을 규명한다. 단백질의 구조를 밝히기 위해서는 분리 및 정제, 결정화, XRD (x-ray diffraction) 또는 NMR (nuclear magnetic resonance)의 순서로 수행해야 한다. 단백질결정의 형태와 결정성장 속도는 용액의 pH, 주변 환경의 온도 및 습도, 첨가제의 영향을 받는다[1]. 결정은 염석효과(salting-out effect)로 인해 생성된다. 염석효과는 염(salt)이 수화된 단백질 분자의 물분자를 제거함으로써 단백질의 용해도를 낮

춰 단백질 분자들을 서로 결합시켜 침전시키는 것이다. 하지만 단순히 무정형의 침전물을 얻는 목적이 아니라 결정형성이 목적이라면 정적인 상태에서 교반없이 장시간 관찰해야 한다.

단백질의 구조 분석은 1960년 myoglobin을 시작으로 현재까지 많은 단백질의 구조가 규명되었다. 이를 통해 단백질의 구조 정보 및 활성부위, 저해제와 결합구조를 통하여 신약 개발을 할 수 있다. 이로써 생명현상을 원자수준에서 이해함으로써 논리적이고 체계적인 바이오 응용 결과를 도출할 수 있다[2].

단백질결정화에 대한 초기 연구는 다양한 방식의 현적법(hanging drop method)에 의해 수행되었다. 하지만 이 방법의 단점은 핵생성과 결정성장 및 성장이 동시에 일어날 수도 있다는 것과 단편계를 장시간 안전하게 보존하기 어렵다는 점이다. 이를 보완하기 위해 본 연구에서는 액적기반의 미세유체 시스템을 사용함으로써 이러한 단점을 보완하였다. 그리고 현적법과는 달리 단백질 수용액과 침전제 수용액의 직접적인 액-액 반응으로 결정화를 수행하였다.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

[‡]이 논문은 KAIST 양지원 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

미세유체장치는 Lab on a chip이라 불리며 기존에 수행된 실험들을 마이크로 단위로 scaling down시키는 실험 장치이다. 이 시스템의 특징은 반응기 내부에 관의 폭이 좁기 때문에 전단응력의 영향이 크고, 레이놀드수가 낮으므로 서로 다른 상(phase)이 항상 층류를 형성한다[3]. 때문에 여러 샘플을 주입할 때 다상류의 반응은 확산현상에 의해 발생하며, 확산속도를 조절하기 위해 유로의 길이나 샘플의 주입속도를 조절한다[4]. 또한, 소량의 샘플만으로도 실험이 가능하기 때문에 시약비용을 절감할 수 있다[5].

현재까지 미세유체 장치를 이용하여 단백질결정화에 대한 연구가 활발히 진행되었다. 실험의 주요 방법은 밸브를 이용한 장치(valve-based system), slipchip 장치(well-based system), 액적 기반 장치(droplet-based system)로 크게 3가지로 분류할 수 있다. 밸브장치는 단백질 수용액 및 침전제 수용액을 서로 마주보는 방향의 유로로 주입하여 웰(well)에 주입시킨 후, 웰과 웰 사이의 밸브로 각 용액의 혼합을 제어할 수 있는 시스템이다. 각각의 용액이 들어가는 웰의 크기를 다르게 하여 두 용액의 혼합비를 다양하게 함으로써 한 번에 많은 결과를 얻을 수 있는 장점이 있지만[6], 미세유체 장치에서 밸브를 이용하는 장치는 최소 두 층(밸브층, 유로층)으로 나뉘어 있기 때문에 장치 제작이 쉽지 않다. Slipchip 장치는 밸브 시스템을 밸브없이 직접 처리하는 방법이다. 단백질 수용액과 침전제 수용액을 주입할 웰이 있는 각각의 판을 준비한 후, 위·아래의 웰이 서서히 미끄러지면서 마주보게 자리를 잡는 방법이다. 한 판에 많은 웰이 있기 때문에 아래의 판에는 침전제의 종류 및 농도를 다르게 하여 다양한 변수를 지정하여 주입할 수 있고, 위의 판에는 목적하는 단백질 수용액을 주입시킨다. 그 후, 두 판을 매끄럽게 접합시키기 위해 마주보는 표면에 오일을 얹게 바르고, 두 판 내부의 웰이 목적하는 만큼 겹치게 하여 웰 내부에서 단백질 결정을 관찰하는 실험방법이다. 밸브 시스템과 마찬가지로 여러 가지 변수에 대해 단 한번에 실험할 수 있는 장점이 있지만, 위·아래의 판을 접합하는 과정에서 웰의 위치조절, 오일 층의 두께 등에서 결함이 생긴다는 단점이 있다[7]. 마지막으로 액적기반 장치는 장치 내에서 혼합되지 않는 연속상과 분산상을 이용하여 액적을 만드는 시스템이다. 각각의 액적들이 서로 다른 미소회분 반응기로서의 역할을 하며, 액적 내부에 원하는 용액들을 정량적으로 배합할 수 있다. 또한 반응기의 부피를 작게 함으로써 반응시간을 줄일 수 있다[8].

본 연구에서는 기계적인 제어가 용이한 액적기반 시스템을 활용하였다. 액적은 기능성 콜로이드 입자로서 의학, 나노기술, 바이오기술 등을 위해 다양하게 설계되고 있고[9], 여러 가지 기능을 삽입할 수 있는 다중 액적생성기술도 개발되었다[10]. 이와 같은 액적을 만들 수 있는 미세유체 장치에는 여러 가지 모델들이 있다. 한 방향으로 흐르는 연속상에 의해 형성된 전단력에 의해 만들어진 순차적인 압력구배로 액적을 만드는 T-junction[11], 연속상에 의한 전단력으로 액적을 형성하지만 연속상을 대칭으로 주입시킴으로써 T-junction보다 안정하게 액적을 만드는 flow-focusing[12], 칩 내부의 원하는 곳에 밸브를 둬서 유체의 흐름과 방향의 제어가 가능한 마이크로밸브[13], 유리모세관과 모세관 니들(capillary needle)의 접합을 이용한 co-flowing stream[14], electrowetting을 통해 액적을 제어할 수 있는 digital microfluidics[15]가 있다.

최근까지 액적 기반의 미세유체 장치를 통해 수행된 단백질결정화 연구는 주로 T-junction 방법에 의한 것이었다. 또한 장치의 외부에 유리모세관을 연결하여 액적을 유리모세관 내에 넣음으로써 온칩

(on-chip)의 방법으로 결정을 관찰하였다. 이로써 현적법의 단점인 장시간 관찰 및 급진적인 반응의 문제는 해결할 수 있었으나 단백질 결정의 핵생성 및 결정의 성장과정을 시간에 따라 관찰하지 못했다.

이 문제들을 해결하기 위해 우선 액적을 T-junction보다 더 안정하게 생성하기 위해 flow-focusing 방법으로 water-in-oil 액적을 만든 후, 직경 3.5 cm 페트리 디쉬 내부와 액적을 고정시킬 수 있는 웰 몰드 내에 액적을 넣어 관찰함으로써 장치 외부에서 관찰하는 오프칩(off-chip) 방법을 이용하였다. 따라서 액적생성 및 액적관찰로 분류되는 두 단계의 실험을 통해 수행하였다.

사용한 단백질은 라이소자임(lysozyme)이며, 침전제(salt)는 NaCl을 사용하였다. 라이소자임은 난백 단백질의 일종이며, 난백 중 함유량이 0.3%로 가장 많은 단백질이다. 체내에서 용균, 단백질의 소화 흡수촉진, 바이러스 불활성화작용을 하는 단백질로서 식품의 보존료, 의약품원료 등에 사용하고 있다[16].

2. 실험

2-1. 실험재료 및 시약

액-액 반응을 위한 분산상 라이소자임(Sigma Aldrich, USA) 수용액과 염화나트륨(Duksan, Korea) 수용액을 3차 증류수로 제조했다. 라이소자임결정화 실험을 위해 pH 4.8, 7.2인 완충용액으로 제조하기 위하여 0.1 M 아세트산 나트륨(Duksan, Korea) 용액을 만들고 염화수소(Oriental Chemical Industries, Korea)로 적정하였다. 라이소자임 완충용액의 농도는 0.025 wt%, 염화나트륨 완충용액의 농도는 10 wt%로 제조하였다[17]. 연속상은 SPAN80(Sigma Aldrich, USA)을 2 wt% 섞은 미네랄오일(Sigma Aldrich, USA)를 사용하였다[18].

미세유체 장치를 만들기 위해 Si-wafer (K1 solution, Korea)와 wafer 위에 양각패턴을 새기기 위해 사용한 PR (photoresist)은 SU-8 (NIPPON KAYAKU, Japan)과 SU-8 developer (NIPPON KAYAKU, Japan)를 사용했고, PDMS (polydimethylsiloxane)으로 이루어지는 반응기(chip) 및 웰 몰드를 제조하기 위해 SYLGARD® 184 silicone elastomer base (Dow Corning, USA)와 SYLGARD® 184 silicone elastomer curing agent (Dow Corning, USA)를 사용하였다.

2-2. 실험기기 및 장치

Si-wafer 위의 패턴의 높이를 조절하기 위해 spin 1200D (MIDAS, England)로 spin coating을 하였고, 양각패턴 형성을 위한 UV 조사기(aligner)로는 MDA-400M-06 (MIDAS, England)를 사용했다. Wafer에 부은 PR액의 수분제거를 위한 가열교반기는 NDK-1K (ASONE, Japan)을 이용했으며, 패턴부분 이외의 UV가 조사되지 않은 PR을 제거하는 현상과정을 GLIPS-G (Global lab, Korea)를 사용했다. PDMS 표면의 O₂ 플라즈마처리는 PLASMA CLEANER (HARRICK PLASMA, USA)로 수행하였다.

샘플은 1.0 ml 부피의 주사기에 담아 펌프(Harvard, USA)를 통해 반응기에 주입했고, 액적형성 및 결정화 과정은 PC에 연결된 광학 현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다. 관찰 중 얻은 이미지는 Image-pro plus (Media cybernetics, CA, USA) 프로그램을 통해 분석하였다.

2-3. 실험방법

2-3-1. 반응기(액적 생성기) 제작

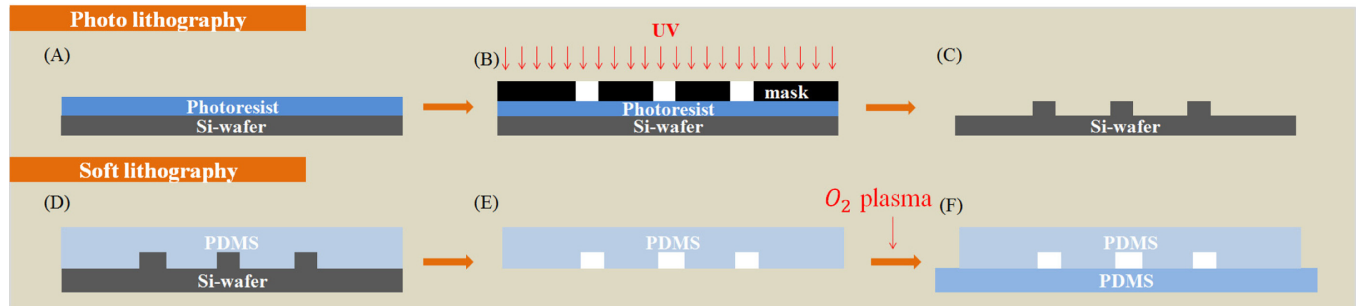


Fig. 1. Fabrication of microfluidic PDMS device; (A) Spin-coating of photoresist on the Si-wafer, (B) UV exposure to mask on the Si-wafer, (C) Putting si-wafer in SU-8 developer to develop wafer, (D) Pouring PDMS on wafer, (E) Detaching PDMS from wafer, (F) Plasma bonding on PDMS with plat PDMS. (PDMS : polydimethylsiloxane)

Fig. 1에서 보듯이 wafer 위에 flow-focusing을 위한 양각패턴을 새기기 위해 먼저 wafer 위에 PR액을 덜어내고 패턴의 높이를 70 μm 로 만들기 위해 1950 rpm으로 30초 간 spin coating을 하고, photolithography 과정을 통해 반영구적으로 실리콘 몰드를 만들 수 있게 하는 마스터 웨이퍼를 제작하고, softlithography를 통해 패턴이 음각화 된 PDMS 몰드를 제작하였다. 제작한 반응기의 주입구 유로 폭은 100 μm , 액적생성 후 액적이 표류하는 유로의 폭은 200 μm 이다.

유로 내에 지배적으로 흐르는 연속상이 소수성이기 때문에 유로 내벽을 소수성화 시킴으로써 생성되는 액적의 안정성을 높일 수 있다. 이를 위해 채널이 없는 평평한 PDMS를 따로 제작하여 채널이 있는 PDMS 몰드와 평평한 PDMS를 O_2 플라즈마 처리를 통해 표면의 친수성으로의 일시적인 개질을 이용하여 접합시키고, 다시 소수성으로 되돌리기 위해 약 24시간 정도 상온에 보관하였다.

2-3-2. 액적고정을 위한 웰(well)몰드 제작

액적을 넣어 고정시키기 위한 십자가(cross) 모양의 웰이 있는 고정몰드 역시 photolithography를 통해 양각패턴을 새긴 후, softlithography를 통해 PDMS 몰드를 제작한다. 반응기에서는 음각부분이 유로가 되지만 웰몰드에서는 음각부분이 Fig. 2와 같이 액적을 보관할 수 있는 각각의 웰이 된다. 십자몰드는 최소 1개에서 최대 5개까지의 액적을 보관할 수 있다.

2-3-3. 라이소자임 결정화 실험

먼저 액적생성을 위해 Fig. 3와 같은 flow-focusing 장치의 inlet 3에 연속상인 미네랄오일을 연결하고, inlet 1과 2에는 각각 분산상인

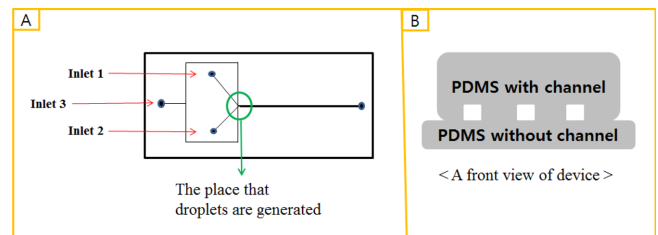


Fig. 3. Microfluidic device for generating droplets; (A) Flow-focusing device used in this experiment, (B) A front view of device.

라이소자임 완충용액과 염화나트륨 완충용액을 연결하였다. 오일유속은 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$, inlet 1과 2의 유속은 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 하여 동시에 주입하였다. 관찰 및 이미지 촬영은 광학현미경에 연결된 컴퓨터를 통해 수행하였다.

형성된 액적은 outlet에 연결된 tube를 통해 직경 3.5 cm 페트리디쉬와 십자 몰드에 각각 옮겼다. 액적의 안정성을 위해 페트리디쉬의 바닥과 각각 몰드의 내부에도 오일을 채웠다. 그 후, 오일의 증발을 막기 위해 페트리디쉬는 뚜껑을 덮고, 십자몰드는 커버 글라스로 덮고 결정화과정을 관찰하였다.

3. 결과 및 토의

세 주입구의 용액을 동시에 주입한 결과 초기에는 유속이 더 빠른 연속상이 유로 내부에서 지배적으로 흐르나 밀도가 더 큰 분산상이 서서히 연속상을 밀고 나와 접합부에서 층류를 형성한다. 그 후 Fig. 4

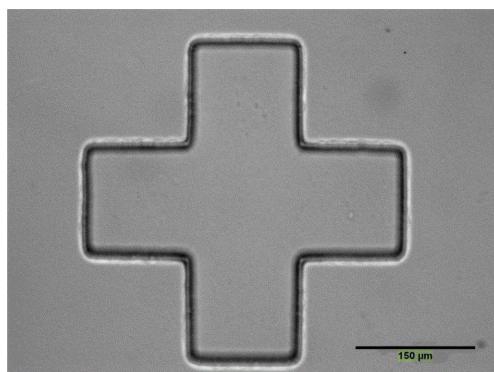


Fig. 2. Cross type mold for trapping droplets.

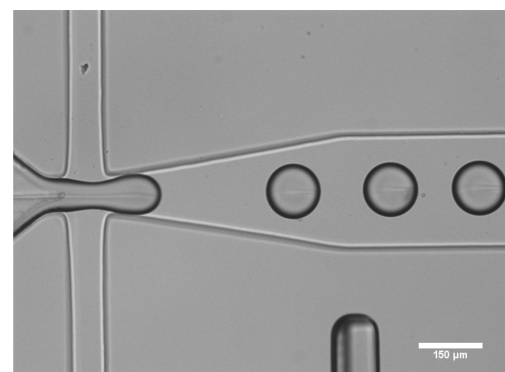


Fig. 4. Generating droplets in flow-focusing device.

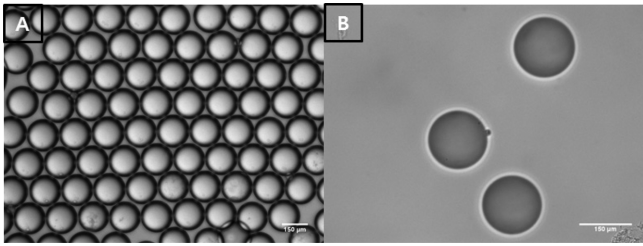


Fig. 5. Droplets in petri dish at initial time; (A) Monodisperse droplets stabilized by surfactant, (B) Individual droplets with distance.

와 같이 대칭적으로 주입되는 연속상에 의해 발생하는 전단력으로 층류흐름을 일정한 간격으로 나누어 주면서 초당 수백 개의 동일한 크기의 액적이 형성되었다. 본 실험에서는 150 µm 직경의 액적을 생성하기 위해 inlet 3과 inlet 1,2의 유속비율을 5:4, 유속은 0.5:0.4 µl/min으로 하였다. 외부로 방출된 액적을 관찰한 결과 모두 동일한 크기로 안정된 상태로 존재하였다. 이는 미네랄오일에 혼합된 계면활성제(SPAN80)가 오일 내의 수용액 액적을 분산시키기 때문이다.

액적을 pH 4.8과 7.2의 수용액으로 만들어 페트리디쉬와 몰드 내에서 관찰하여 결과를 비교하였다. 먼저 pH 4.8 용액으로 만든 액적을 페트리디쉬와 몰드에 각각 보관하여 차이를 비교하였다. 외부에 연결된 tube로 페트리디쉬에 옮긴 결과 Fig. 5A처럼 다수의 액적이 계면활성제의 영향으로 붙어있는 형태와 Fig. 5B처럼 액적이 떨어져 있는 두 가지 형태를 볼 수 있었다. 계면활성제는 Fig. 5A와 같이 액적 집단을 유지시켜준다. 그리고 24시간 후에 몇몇의 액적 내부에서 라이소자임의 결정을 볼 수 있었다.

Fig. 6A에서 C까지는 홀로 떨어져 있던 액적 내부에서는 소수의 결정이 액적 내부를 채울 때까지 성장함을 알 수 있었고, Fig. 6A에서 삼각형 내부에 있는 구형태의 집합이 작은 결정형태라는 것을 알

수 있었다. Fig. 6B는 미량의 부피감소가 일어났고, 소수의 결정이 액적내부를 채울 때까지 성장함을 볼 수 있었다. Fig. 6C의 결정형태는 매우 불안정해 보이는데, 이는 액적 내부 수용액이 증발로 인해 부피가 줄어들고, 용액의 농도가 농축됨에 따라 결정이 급하게 형성된 것으로 보였다.

Fig. 6D와 E는 반면에 여러 개의 액적 내부에서는 액적 간의 상호작용이 있음을 짐작할 수 있었다. 처음에는 동일한 크기의 액적이었지만 시간이 갈수록 특정한 액적의 부피가 커지고, 그 주변의 액적은 부피가 작아지는 현상을 보였다. 그 후, 부피가 증가한 액적 내부에서 다수의 결정이 생성되었다. 주변의 영향으로 커진 액적 내부의 결정은 Fig. 6D, 6E에서 볼 수 있듯이 주로 액적의 내부표면에서 형성되었다. 그리고 큰 액적내부에서 역시 작은 결정형태를 볼 수 있었다. 이로 인해 액적의 크기가 클 때, 액적 내부에 단백질과 침전제의 농도가 변하여 크기가 작을 때보다 결정형성에 용이하고, 다수의 결정이 생성됨을 알 수 있었다. 결정모형의 대부분은 판상형(plate-like structure)이었다.

페트리디쉬 내부에서 관찰한 결과, 서로 떨어져 있는 액적과 액적이 인접하여 옆 액적에 영향을 주는 현상이 관찰되었다. 두 경우에서 형성된 결정이 크기는 비슷했으나 큰 액적에서 더 많은 결정이 형성되었다. 페트리디쉬에서 라이소자임의 결정을 관찰할 수 있었지만 페트리디쉬에 외부충격이 가해지거나 또는 약간의 움직임이 있어도 액적들이 이동하여 떨어져 있던 액적들이 서로 붙는 단점이 있었고, 어느 한 액적에 초점을 고정해서 시간별로 추적을 하는 데에 어려움이 있었다.

다음은 pH 4.8에서 십자몰드에 액적을 1개 및 2개를 넣어 관찰하였다. Fig. 7A와 같이 몰드에 액적을 하나만 넣어 관찰한 결과 24시간 후에 결정을 볼 수 있었다. Fig. 7B는 액적의 부피가 유지되면서 큰 결정을 중심으로 주변에 다수의 작은 결정들이 형성되었다. 다른 몰드의 내부에서는 액적의 부피가 줄어들면서 내부에 결정이 형성되

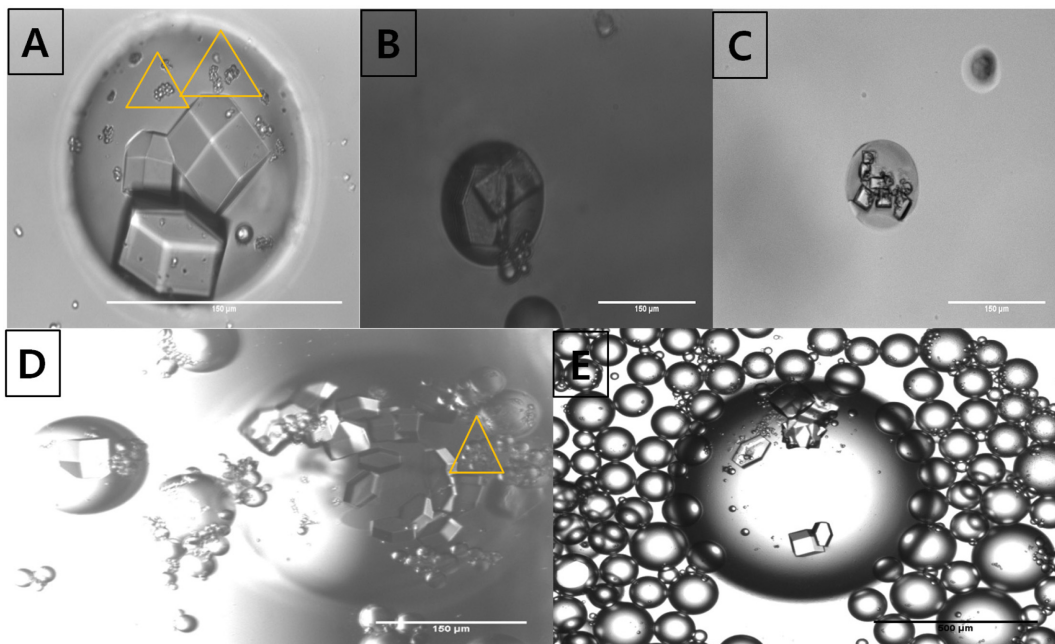


Fig. 6. Optical image of droplets in petri dish at pH 4.8 after 24 hours; (A) Single droplet containing a few crystals with maintaining its size, (B) Crystals in single droplet with decreasing volume, (C) Crystals in single droplet with decreased volume, (D) Many crystals in multiple droplets, (E) Crystals formed at inner surface of droplets.

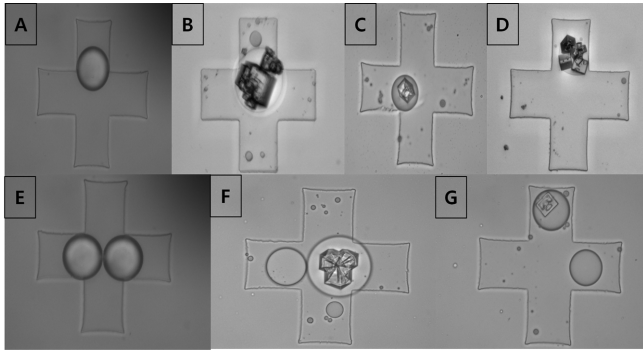


Fig. 7. Droplets in cross type mold at pH 4.8 at initial (A,E) and after 24 hours (B,C,D,F,G); (A) A droplet in mold at initial time, (B) Crystals in a droplet, (C) Single crystal in evaporated droplet, (D) Multiple crystals in droplet, (E) Two droplets in mold at initial time, (F) Single crystal in a droplet showing volume change in two droplets, (G) One droplet moving apart by the crystal in another droplet and rotation occurring in crystal-containing droplet.

었다(Fig. 7C, 7D). Fig. 7C는 부피가 감소하면서 내부에 단일결정이 형성되었지만, Fig. 7D는 작은 액적에 다수의 결정이 형성되면서 액적의 구(sphere)형태가 변화하였다. 이는 내부의 증발과 결정형성이 동시에 급속도로 이루어져 액적형태에 영향을 끼친 것으로 보인다.

2개의 액적을 넣어 관찰한 몰드에서는(Fig. 7E) 두 가지 현상을 볼 수 있었다. 첫 번째 경우는 페트리디쉬에서 보았듯이 한 액적의 부피가 줄어들면서 인접한 액적 부피를 크게 만들고, 부피가 커진 액적 내부에서 단일 결정이 형성되었다(Fig. 7F). 이는 부피가 페트리디쉬보다 인접한 액적의 수가 적어 부피증가량이 크지 않아 소수의 결정이 합쳐진 형태로 보인다. Fig. 7G에서는 붙어 있는 두 액적 중 한 액적에서 결정이 급하게 생성되며, 생성된 결정으로 인해 무게중심이 이동하여 액적이 회전한다. 회전하는 힘이 앞선 Fig. 5A에서 토의한 바와 같이 두 액적을 연결하는 계면활성제의 힘보다 강해서 회전하여 액적이 떨어져 이동하는 원동력이 된다.

요약하면 Fig. 6과 Fig. 7에서는 pH 4.8일 때 판상형 또는 다면체의 결정이 형성되고, 인접한 액적의 영향을 받아 부피가 증가한 액적 내부에서는 다수의 결정이 형성됨을 알 수 있었다. 또한, 라이소자임 결정은 액적의 중심보다는 표면 근처에서 생성되었다.

Fig. 8에서는 pH 7.2의 수용액으로 액적을 만든 후, 외부 tube를 통해 페트리디쉬 안에 액적을 넣었다. pH 4.8일 때와는 달리 액적이 떨어져 있는 부분은 없었고, Fig. 8A와 같이 모든 액적이 계면활성제의

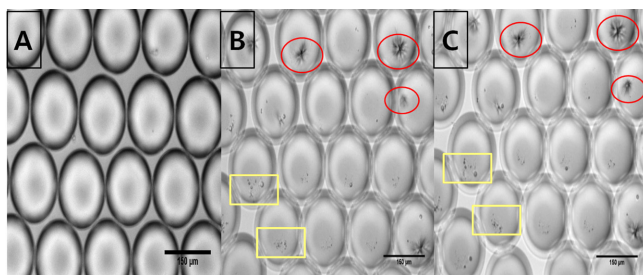


Fig. 8. Droplets in petri dish at pH 7.2; (A) Monodisperse droplets at $t=0$, (B) Image of droplets containing needle structure crystals at $t=180$ min, (C) Optical image after 6 hours.

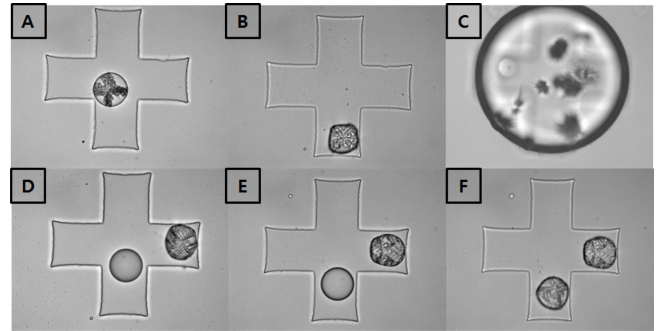


Fig. 9. Droplets in mold at pH 7.2; (A) Needle structure crystal image after 2 hours, (B) Crystal penetrating out droplet, (C) Many crystals in big droplet covering mold after 2 hours, (D) Droplets drifting apart and one droplet containing crystal after an hour, (E) Optical image of 'D' after 2 hours, (F) Optical image of 'D' after 3 hours.

영향으로 붙어 있었다. 붙어있는 수많은 액적 중 한 부분을 3시간 단위로 관찰한 결과, pH가 4.8일 때와는 달리 Fig. 8B의 원형표시와 같이 결정을 3시간 만에 관찰할 수 있었고, 사각형으로 표시한 작은 결정을 포함한 액적도 있었다. 결정형태는 침상형(needle structure)이었고, 계면에 가까운 곳에서 형성됨을 알 수 있었다. 하지만, 시간이 경과될수록 액적들 간의 사이가 멀어져 장시간 동안 한 초점에 고정하기 어렵다는 단점이 있었다.

페트리디쉬 내에서 pH 4.8과 7.2일 때 모두 결정을 볼 수 있었다. pH 4.8일 때는 다면체 및 판상형 결정이 형성되었고, pH 7.2에서는 침상형 구조가 형성되었다. 결정형성시간은 pH 7.2일 때가 더 짧았다.

Fig. 9A에서 D는 pH 7.2에서 십자몰드 내부에 액적을 1개 및 2개를 넣어 관찰한 결과이고, 한 몰드에는 부피가 큰 액적을 올려 관찰하였다(Fig. 9C). 1개의 액적이 들어 있는 몰드에서는 2시간 후에 처음으로 결정을 관찰할 수 있었고, 결정이 형성됨에 따라 액적의 부피가 감소했음을 알 수 있었다. 결정형태는 Fig. 8과 동일하게 침상형이 형성되었고(Fig. 9A), Fig. 9B처럼 결정이 형성되면서 액적 표면이 파괴됨을 볼 수 있었는데, 이는 침상결정이 막을 찢어서 생긴 것으로 짐작된다. Fig. 9C는 직경이 약 3배가 되어 몰드를 덮는 액적인데, 앞선 pH 4.8에서의 페트리디쉬 실험(Fig. 6)에서 보았듯이 액적의 크기가 클수록 크기는 비슷하지만 다수의 결정이 형성됨을 확인할 수 있었다.

Fig. 9D-F는 Fig. 7E처럼 2개의 액적을 넣은 후, 일정한 시간차를 두고 관찰한 결과이다. 한 시간이 경과되자 Fig. 9D와 같이 한 액적에서 결정보다는 침전에 가까운 결정이 급 생성되면서 Fig. 7G와 같이 액적 내부의 밀도 차에 의한 회전력으로 두 액적이 서로 밀려났다(Fig. 9D, 9E). 3시간 후, Fig. 9F와 같이 결정이 생성되지 않았던 액적 내부에도 결정이 형성되었다. 하지만 두 액적 모두 완벽한 구 형태를 유지하지 못한 것을 봤을 때, 침상형 결정이 급 생성되면서 표면구조에 영향을 준 것으로 보인다.

한 액적에서 결정이 생성하며 무게중심의 변화에 의한 회전력이 인접한 액적을 움직이는 현상을 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 10A에서 오른쪽 액적 내에 결정이 생겨 액적이 화살표방향(→)으로 회전하며, 이에 대한 반작용으로 왼쪽 액적이 다른 화살표(←)방향으로 움직인다. Fig. 10B는 25초 후의 두 액적의 위치를 나타낸 것이다.

이로써 pH 7.2에서는 침상형 결정이 생성됨을 볼 수 있었다. pH

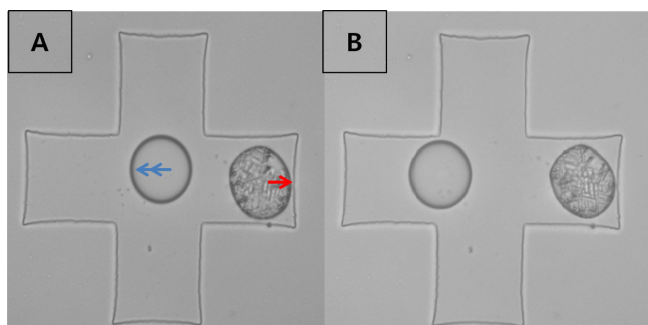


Fig. 10. Interaction between two droplets; (A) Droplet containing crystal makes the other droplet move to the left direction, (B) The left droplet moves further to the left direction after 25 sec.

4.8일 때와 같이 액적의 크기가 클수록 다수의 결정이 형성된다는 공통점도 있었다. 침상형의 결정은 대부분의 작은 액적에서 표면구조에 영향을 주었음을 알 수 있었다.

4. 결 론

라이소자임 단백질 결정화실험에 현적법 또는 미세유체 시스템의 온칩방법과는 다르게 액적기반의 미세유체 시스템 중 오프칩방법을 적용시켜 액적의 pH가 4.8일 때와 7.2일 때의 결정생성을 비교하였다.

페트리디쉬관찰과 십자물드관찰 모두 pH 4.8일 때는 다면체 및 판상형 결정이 형성되었고, pH 7.2일 때는 침상형구조가 형성되었다.

페트리디쉬실험 중 pH 4.8에서 액적이 홀로 있을 때에는 본래의 부피를 유지하면서 내부에서 소수의 결정이 생성되거나 액적 내부의 증발로 인해 부피가 감소하면서 결정이 생성되었다. 여러 액적이 인접했을 때는 한 액적이 주변 액적으로부터 영향을 받아 부피가 커지고, 부피가 커진 액적 내부에서 다수의 결정이 형성되었다. pH 7.2에서는 액적들이 본래의 부피를 유지하면서 내부에 침상형 결정이 형성되었다.

십자물드에는 각각의 pH에 대해 1개 또는 2개의 액적을 넣고 관찰한 결과 pH 4.8의 경우, 액적이 1개 들어있는 몰드에서는 액적이 본래의 부피를 유지하며 결정이 생성되거나 부피가 감소하면서 결정이 형성되었다. 2개의 액적이 들어있는 몰드에서는 한 액적은 부피가 감소하고, 다른 액적은 부피가 증가하면서 커진 액적 내부에서 결정이 형성되었다. pH 7.2에서는 홀로 있는 액적에서는 부피가 감소하면서 침상형결정이 생성되었다. 2개의 액적을 담은 몰드에서는 한 액적에서 먼저 결정이 생성되어 액적 내 밀도차로 인한 회전력으로 인해 붙어 있던 액적이 서로 떨어짐을 알 수 있었다. pH 7.2일 때 침상형 결정이 생성되면 액적의 표면에 영향을 미치는 것도 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국연구재단의 기본연구과제의 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

References

1. Alderton, G. and Fevold, H. L., "Direct Crystallization of Lysozyme from Egg White and Some Crystalline Salts of Lysozyme," *Bio. Chem.*, **164**, 1(1946).
2. "The study on structural proteomics and practical use technique of new medicine development," Biotech Policy Research Center, 2010.
3. Atencia, J. and Beebe, D. J., "Controlled Microfluidic Interfaces," *Nature*, **437**(7059), 648-655(2005).
4. Seo, S. W., Ko, K. Y., Lee, C. S. and Kim, I. H., "Biomaterialization in Microfluidic Crystallizer," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **51**(1), 151-156(2013).
5. Auroux, P.-A., Iossifidis, D., Reyes, D. R. and Manz, A., "Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications," *Anal. Chem.*, **74**, 2637-2652(2002).
6. Li, L. and Ismagilov, R. F., "Protein Crystallization Using Microfluidic Technologies Based on Valves, Droplets, and Slipchip," *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 139-158(2010).
7. Du, W., Li, L., Nichols, K. P. and Ismagilov, R. F., "Slipchip," *Lab chip*, **9**(16), 2286-2292(2009).
8. Jung, J. H. and Lee, C. S., "Droplet Based Microfluidic System," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **48**(5), 545-555(2010).
9. Kang, S. M., Choi, C. H., Kim, J. M. and Lee, C. S., "Synthesis Technology of Functional Colloid Particles and Its Applications," *Clean Technol.*, **18**(4), 331-340(2012).
10. Kang, S. M., Choi, C. H., Hwang, S. R., Jung, J. M. and Lee, C. S., "Microfluidic Preparation of Monodisperse Multiple Emulsion using Hydrodynamic Control," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **50**(4), 733-737(2012).
11. Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H. and Quake, S. R., "Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-generating Microfluidic Device," *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 4163-4166(2001).
12. Anna, S. L., Bontoux, N. and Stone, H. A., "Formation of Dispersions Using 'Flow focusing' in Microchannels," *Appl. Phys. Lett.*, **82**, 364-366(2003).
13. Zeng, S., Li, B., Su, X., Qin, J. and Lin, B., "Microvalve-actuated Precise Control of Individual Droplets in Microfluidic Devices," *Lab Chip*, **9**, 1340-1343(2009).
14. Utada, A. S., Lorenceau, E., Link, D. R., Kaplan, P. D., Stone, H. A. and Weitz, D. A., "Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device," *Science*, **308**, 537-541(2005).
15. Fair, R. B., "Digital Microfluidics: Is a True Lab-on-a-chip Possible?," *Microfluidics and Nanofluidics*, **3**, 245-281(2007).
16. Huh, Y. S., Kim, H. W. and Kim, I. H., "Purification of Lysozyme from Egg White by Multicycle Ion Exchange Chromatography," *Korean Journal of Biotechnology and bioengineering*, **18**(2), 122-126(2003).
17. Carvajal, C. and McDonald, K., "Growth and Characterization of Lysozyme Crystals in Varying Precipitants," *Young Scholars Program*, 2010.
18. Baret, J. C., "Surfactants in Droplet-based Microfluidics," *Lab Chip*, **12**, 422-433(2011).