

전류법을 이용한 생체물질 DNA 검출 마이크로칩

주기성*, sandeep*, 김용상**

*명지대학교 나노공학과, **명지대학교 전기공학과

biomolecule DNA detection using Microchip with amperometry

Gi-sung Joo*, Sandeep Kumar Jha*, Yong-Sang Kim**

Dept. of Nano Science & Engineering, Myongji University*

Dept. of Electrical Engineering, Myongji University**

Abstract - 마이크로칩에서의 생체물질 분석에 있어서 재현성은 매우 중요한 사항이다. 이전부터 많은 연구자들에 의해서 분석시 재현성을 향상시키고자 많은 연구가 선행되었다. 재현성을 향상시킬 수 있는 한 방안으로 겔 전기영동이 이용되고 있다. 본 연구에서도 겔 전기영동을 마이크로칩에 접목시켜 재현성을 향상시키는 실험을 진행하였다. DNA 시료로 100bp부터 1500bp 길이의 DNA 단편들을 사용한 결과 인산완충식염수 (PBS)만을 사용하였을 경우보다 인산완충식염수(PBS)와 5% 폴리아크릴아미드 겔 (5% polyacrylamide)과 같이 사용하였을 경우 더 향상된 재현성을 확보하였다.

1. 서론

DNA와 같은 생체물질들의 분석은 질병 분석이나 과학수사, 계통 분석 등의 적용에서 매우 중요한 요소이다. 이러한 생체물질의 분석에 있어서 겔 전기영동은 매우 유용한 방법 중의 하나로 인식되어진다. 생체물질의 분리 분석에 적합한 겔 전기영동과 소형화, 다른 분석 시스템과의 집적성, 그리고 낮은 시료 소모의 장점을 가지는 마이크로칩의 적용은 생체물질 분석 시스템을 연구하는 연구자들의 관심을 일으키고 있다. 하지만 겔 전기영동을 이용한 마이크로칩에서의 분석 방법은 주로 형광물질을 부착한 형광분석을 사용하고 있다[1-3]. 형광분석 방법을 사용한 마이크로칩에서의 겔 전기영동은 이전의 다른 연구자들의 논문에서 그 재현성이 검증이 되었다. 하지만 형광분석 방법이 가지는 형광물질의 부착에 따른 시간과 직접적인 시료의 주입을 위해서 본 연구에서는 전류법을 사용하여 형광분석 방법이 가지는 단점을 보완하고자 하였다[4]. 또한 이전의 PBS만을 사용한 분석에서 보이는 낮은 재현성을 개선하고자 형광 분석법에서 증명된 폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 전류법을 적용한 마이크로칩에서의 재현성 개선 실험을 진행하였다.

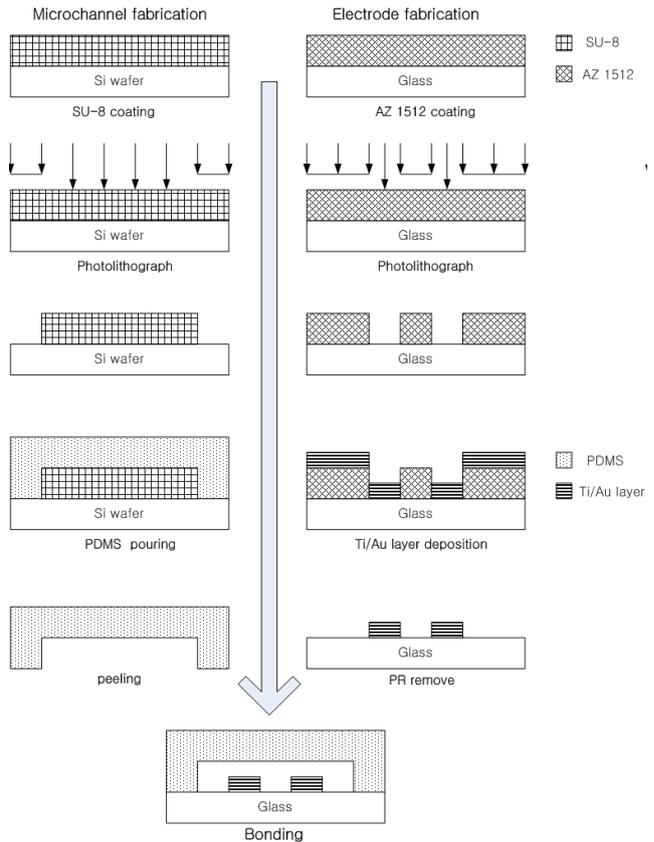
2. 본론

2.1 마이크로칩의 제작

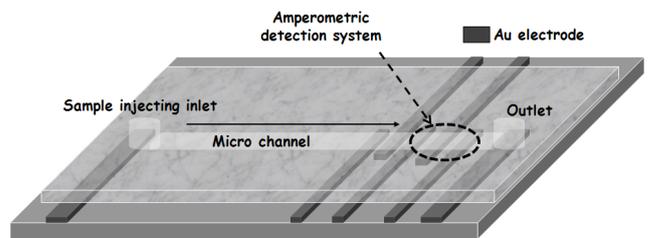
본 연구에서는 겔 전기영동을 이용한 DNA의 분석 실험을 위해서 생체물질에 대해서 안정성이 검증된 유리기관과 PDMS를 사용하였다. 모세관 전기영동에 의해 분리되어 이동되어진 DNA들을 전류법으로 분석하기 위한 전극이 위치한다. 그림 1은 유리기관 위에 금 전극을 형성시키는 과정과 PDMS에 마이크로 채널을 형성시키는 과정을 보여준다. 유리기관 위에 금전극을 마이크로 크기로 패터닝 기관과 마이크로채널이 형성된 PDMS (polydimethylsiloxane)을 이용하여 마이크로칩을 제작하였다. 마이크로 채널이 형성된 PDMS의 제작을 위해서 실리콘 웨이퍼에 음성 감광액(negative photolithography, SU-8)을 사용하여 높이 200 μ m와 250 μ m 폭의 마이크로 채널을 2cm 길이로 사진 공정으로 제작을 하였다. 반면 전극은 양성 감광액(positive photolithography, AZ1512)으로 전극 패터닝을 위한 희생층을 제작 후 열기상증착 장비를 이용하여 전극을 형성하였다. 이 과정에서 유리와 금 전극 사이의 접착력을 향상시키기 위해서 타타늄을 접착층으로 사용하여 금 전극을 형성하였다. 금전극과 타타늄 박막의 높이는 각각 100nm와 1nm이다. 제작된 마이크로 채널 PDMS 와 금 전극이 형성된 유리기관은 자외선 (UV-O₃) 클리너를 이용하여 접착하였다. 그림 1. (b)는 완성된 마이크로칩의 개념도를 나타낸다. 완성된 마이크로칩에 PBS와 폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 DNA 분석 실험을 진행하였다.

2.2 전기영동 과정

우리는 본 실험에서 1X PBS 용액과 5% 폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 DNA 분석 실험을 진행하였는데 20X PBS 용액을 구매하여 DI water를 사용하여 희석시켜 원하는 1X PBS 용액을 제작하였다.



<그림 1. PDMS/Glass 마이크로칩의 제작과정>

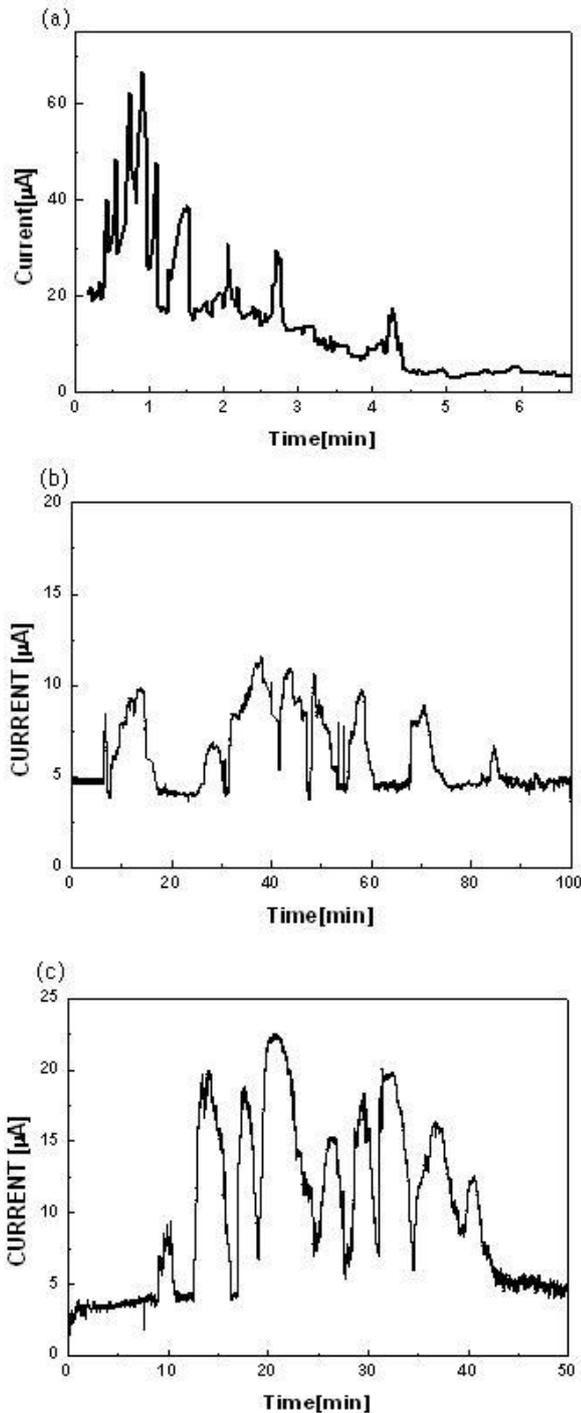


<그림 2. 마이크로칩의 개략도>

5% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서도 1X PBS 용액을 사용하여 40% 아크릴아미드/비스아크릴아미드 용액을 사용하여 1X PBS 용액과 폴리아크릴아미드 용액의 비율을 7:1로 혼합하여 5% 폴리아크릴아미드 용액을 구성하였다. 이 겔 혼합물에 폴리아크릴아미드들의 교차 결합을

위하여 과황산암모늄 (ammonium persulfate)와 테트라메틸에틸렌디아민 (TEMED)을 첨가하였다.

앞에서 만든 1X PBS 용액과 5% 폴리아크릴아미드 겔을 각각 제작된 마이크로칩에 주입하여 전기영동의 버퍼 용액으로 사용하였다. 5% 폴리아크릴아미드 겔의 경우 겔이 형성되기 전에 마이크로칩에 즉시 주입하였다. 버퍼 용액이 각각 주입된 마이크로칩의 채널에 전계를 인가해



〈그림 3. DNA 단편들의 전기영동도. (a) 1X PBS 용액에서의 전계 150V/cm, 5%폴리아크릴아미드에서의 전계 (b)100V/cm, (c) 150V/cm 인가.〉

주어 시간에 따른 측정 전극의 전류값을 측정하여 DNA의 분석 실험을 진행하였다. DNA 시료로는 100 bp부터 1500bp까지 길이의 DNA 9개 단편들을 이용하였다. 모세관 전기영동에 의해서 채널 내에 분리되는 DNA들을 키슬리-236을 이용하여 0.8V를 인가하고 시간에 따른 전류를 측정하였다.

2.3 결과 및 토론

그림 3은 1X PBS 용액과 5% 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 모세관 전기영동 실험에서의 전기영동도를 나타낸다. 150V/cm의 전계를 인가한 실험에서 1X PBS 용액만을 사용한 실험에서 5% 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 실험보다 DNA들의 분석 시간이 적은 것을 확인할 수 있다. 하지만 1X PBS 용액만을 사용한 반복 실험에서 DNA들의 분석 시간이 일정하지 않고 변차를 나타내는 것을 확인하였다. 반면 5% 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 실험에서의 반복 실험에서는 1X PBS 용액만을 사용한 반복 실험보다 향상된 재현성을 보여준다. 5% 폴리아크릴아미드 겔을 사용함으로써 채널 표면에 일정한 전기 삼투적 흐름이 형성되어 향상된 재현성을 보인다. 5% 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 각각 100V/cm와 150V/cm의 전계를 인가하였다. 인가된 전계에 따라서 DNA 단편들의 분석 시간이 변화하는 것을 보인다. 이 실험을 통해서 DNA 단편들의 전계 의존성을 확인하였다.

3. 결론

본 연구에서는 PBS 용액과 5% 폴리아크릴아미드 겔이 혼합된 PBS 용액을 각각 사용하여 DNA 단편들의 분석 실험을 하였다. 5% 폴리아크릴아미드 겔을 이용함으로써 PBS 용액만을 사용하였을 때 보다 더 향상된 재현성을 나타내었다. 하지만 5% 폴리아크릴아미드를 사용함에 따라 DNA 단편들의 분석 시간이 증가하는 것을 확인하였다. 재현성은 향상되었으나 마이크로칩에서의 분석 시간이 증가하는 단점을 보임에 따라서 분석 시간을 감소시키는 연구가 필요하다. 이에 따라 앞으로의 연구 방향은 재현성은 더 향상시키면서 분석 시간을 감소시키는 연구가 지속되어야 한다.

[참고 문헌]

- [1] Stephen, C., Jacobson, J. and Ramsey, M., "Integrated Microdevice for DNA Restriction Fragment Analysis", *Anal. Chem.*, Vol. 68, pp.720~723, 1996
- [2] N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba, "Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field", *Anal. Chem.*, Vol. 76, pp.15~22, 2004
- [3] Chiung-Wen Kuo, Jau-Ye shiu, Kung Hwa Wei, Peilin Chen, J. "Monolithic integration of well-ordered nanoporous structures in the microfluidic channels for bioseparation". *Chromatogr A*, Vol, 1162, pp. 175~179. 2007
- [4] Muhammad J. A. Shiddiky, Md Aminur Rahman, Jang-Su Park, Yoon-Bo Shim, " Analysis of polymerase chain reaction amplifications through phosphate detection using an enzyme-based microbiosensor in a microfluidic device", *Electrophoresis* (2006) Vol. 27, pp. 2951-2959