

액적 기반 미세유체 시스템을 이용한 엔지오제닌의 정량분석 Quantitative Analysis of Angiogenin Using New Biochip Platform

김길중, 최재원, 김학용
충북대학교

Gil-Jung Kim, Jae-Won Choi, Hak Yong Kim
Chungbuk National University

요약

신생혈관 형성은 기존에 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관을 형성하는 기작으로 정상 세포에서 상처 치유, 세포의 발생 및 성장에 관여한다고 알려져 있다. 더 중요한 것은 이 기작이 암의 성장 및 전이에서도 매우 중요한 역할을 하고 있다는 사실이다. 특히, 엔지오제닌(Angiogenin)이 신생혈관형성을 촉진하는 것으로 알려져있다. 이러한 주요 물질을 최신 바이오칩 기술 중 하나인 액적 기반 미세유체 시스템을 활용하여 1 나노리터 수준의 시료 내에 존재하는 엔지오제닌을 정량하는 기술을 개발함으로써 현재 일반적으로 사용되고 있는 정량 기술에 비해 시간뿐만 아니라 비용을 절감할 수 있음을 보여주었다. 이외에도 본 연구에서 개발한 액적 기반 미세유체 시스템 기술은 수은과 같은 중금속의 검출도 가능하기 때문에 환경 센서로의 활용 가능성을 보여준다.

I. 서론

엔지오제닌은 123개의 아미노산으로 이루어진 단일사슬의 염기성 단백질로써 분자량은 약 14 kDa이며 상처 치유, 세포의 발생 및 성장에 관여 할 뿐만 아니라 신생혈관을 형성하는 주요 인자로 알려져 있다. 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 것을 신생혈관형성이라 하며 적은 양의 엔지오제닌으로도 유도된다. 특히, 암의 성장 및 전이에 있어 매우 중요한 역할을 하여 간암, 신장암, 췌장암, 유방암, 자궁암, 대장암, 위암, 그리고 방광암 등 다양한 암에서 엔지오제닌이 과다발현 되어 암의 증식에 관여하고 있다. 따라서, 엔지오제닌의 정량분석은 암의 진단 및 예측에 있어 매우 유용하게 활용 될 수 있을 것이다.

미량의 엔지오제닌을 검출하기 위해 액적 기반 미세유체 시스템을 도입하였다. 먼저 액적 기반 미세유체 칩을 통해 서로 섞이지 않는 수용상(aqueous phase)과 오일상(oil phase)을 흘려줌으로써 액적을 만들어 기존의 미세유체 시스템의 단점인 확산(dispersion), 상호 오염(cross-contamination) 등을 보완하였으며, 하나의 액적이 하나의 실험으로 나뉠 수 있다. 더욱이, 1 나노리터 수준의 액적을 초당 1천 개에서 1만 개 수준으로 만들어 사용되는 시료의 양을 최소화할 수 있다. 다음으로, 칩상에 만들어지는 각 액적을 형광/편광 검출 기술을 적용하여 정량 분석하였다. 이 검출 기술은 시료 분석을 위한 전처리 단계인 세척, 고정, 분리 등이 생략되어 보다 신속, 간단하게 정량 분석이 가능하다.

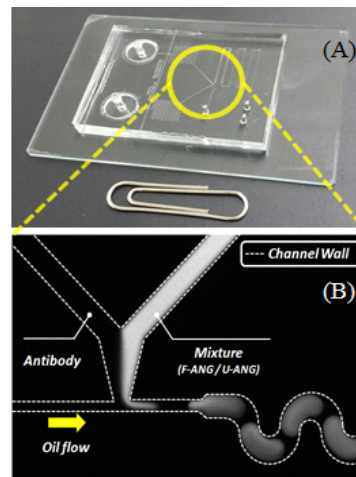
본 연구에서는, 액적 기반 미세유체 기술과 형광/편광 검출 기술을 결합한 새로운 시스템으로 엔지오제닌의 정량분석을 기존에 검출을 위해 사용되던 실험방법에 비해

간단, 신속하며, 시료의 소비량을 줄일 수 있어 시간뿐만 아니라 비용을 절감 하였으며, 특히, 미량의 엔지오제닌을 검출할 수 있음을 보여주었다.

II. 본론

1. 액적 기반 미세유체 칩

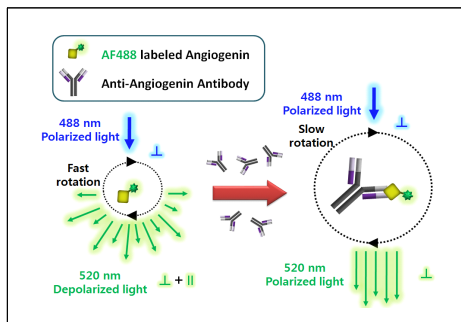
Polydimethylsiloxane(PDMS)을 통해 좁은 통로 (너비 100 um, 높이 50 um)가 있는 칩을 만든다(그림 1A). 그 안에 각 시료와 오일을 흘려줌으로써 액적을 만들어준다. 생성된 액적은 곧바로 구불구불한 통로를 따라 이동하며 시료들이 섞여 상호작용을 하게 된다(그림 1B).



▶▶ 그림 1. (A) 액적 기반 미세유체 칩. (B) 액적 생성 형광 이미지.

2. 형광/편광 검출

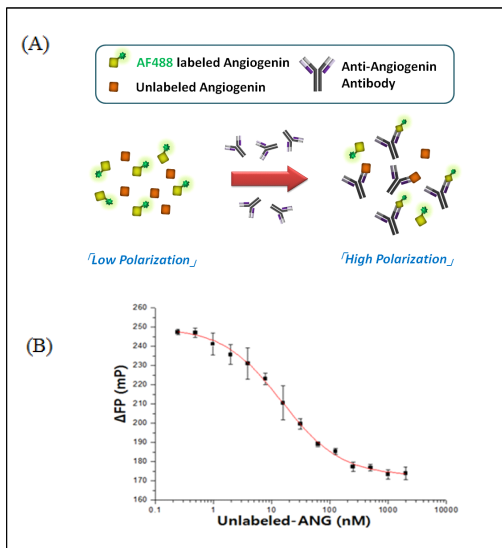
앞서 기술한 액적 기반 미세유체 칩과 형광/편광 검출 기술을 결합하여 시료 내 물질의 정량분석을 하였다. 이 검출 기술은 분자량이 작을 때에는 낮은 편광도를 갖지만 상호작용에 의해 분자량이 커지게 되면 편광도가 커지는 원리로, 분자량이 작은 물질에 형광체를 붙여야 분석이 가능케 된다. 하지만 세척, 고정, 분리 등의 전처리 과정을 생략할 수 있어 분석을 위한 시간 및 비용을 절감할 수 있는 장점을 지니고 있다. 엔지오제닌 정량분석을 위해 분자량이 10 배 큰 항체를 이용하여 각 액적 내에서 이 둘의 상호작용을 통해 정량분석을 수행하였다 (그림 2).



▶▶ 그림 2. 형광/편광 검출의 원리.

3. 엔지오제닌 정량분석

액적 기반 미세유체 칩과 형광/편광 검출 기술을 결합한 시스템을 통하여 미량의 엔지오제닌을 정량 분석하였다. 형광체가 표지된 엔지오제닌과 함께 넣어주는 형광체가 표지되지 않은 엔지오제닌의 농도에 따라 항체에 붙는 경쟁적 반응 결과를 통해 우유 내 함유되어 있는 미량의 엔지오제닌을 정량 분석할 수 있음을 보여주었다 (그림 3).



▶▶ 그림 3. (A) 엔지오제닌 정량분석의 전체 모식도. (B) 우유 내 엔지오제닌의 양에 따른 편광도 변화 그래프.

따라서, 혈액 또는 증식하는 암 조직 내에서의 엔지오제닌의 정량 분석 또한 가능성을 보여주었다.

III. 결론

암의 증식에 중요한 역할을 하는 엔지오제닌을 액적 기반 미세유체 시스템을 통하여 시간과 비용의 절감을 할 수 있었으며, 미량의 시료에서도 정량분석이 가능함을 보여주었다.

이 외에도 이러한 액적 기반 미세유체 시스템이 칩 내의 통로 변형, 다른 시스템과의 통합이 쉽게 가능하다. 때문에 단백질-단백질 상호작용 같은 생체 내의 반응들의 연구뿐만 아니라 수은과 같은 중금속의 검출도 가능하기 때문에 환경 센서로의 활용성을 보여줌으로써 다양한 분야에서 효과적으로 이용될 수 있는 매우 유용한 분석 도구로 사용될 수 있음 보여준다.

■ 참고 문헌 ■

- [1] Chang, S.I., Jeong, G.B., Park, S.H., Ahn, B.C., Choi, J.D., Chae, Q., Namgoong, S.K., Chung, S.I., "Detection, Quantitation, and Localization of Bovine Angiogenin by Immunological Assay", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 232, pp.323-327, 1997.
- [2] Choi, J.W., Kang, D.K., Park, H., deMello, A.J., Chang, S.I., "High-throughput analysis of protein-protein interactions in picoliter-volume droplets using fluorescence polarization", *Anal. Chem.*, Vol. 84, pp.3849-3854, 2012.