

◆ 특집 ◆ Bio-technology

유전자 진단을 위한 칩 위의 실험실

임근배*, 조윤경*

Lab-on-a-chip for Genetic Diagnostics

Geunbae Lim*, Yoon-Kyoung Cho*

Key Words : MEMS (미세가공기술), BioMEMS (생물응용 미세가공기술), Lab-on-a-chip (칩 위의 실험실), DNA chip (DNA 칩), Microfluidics (미세유체역학), Biosensors (바이오센서)

1. 서론

최근 MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 기술의 가장 촉망 받는 응용 분야 중 하나가 생물/의학 분야라고 할 수 있다. 이 분야에 응용된 microdevice 의 예는 무수히 많지만, 최근에 발표된 review 논문을 인용하면, Fig. 1에 나타낸 바와 같이 (1) medical diagnostics (의학 진단 분야), (2) drug delivery (약물 운반 시스템), (3) neural prosthetics, tissue engineering (생체 보철 공학 및 인공 장기)과 (4) minimally invasive surgery (생체 침해를 최소화한 수술) 등의 분야로 구분할 수가 있다. 이 그림에 서는 향후 5년 동안 연구 및 의료 산업에서 가장 중요하게 될 응용분야를 기술적 어려움의 정도와 개발 기간에 따라 표시하였다.^[1]

의학 진단 분야는 biosensor 나 microvalves 또는 micropumps 와 같은 각종 microfluidics 요소 기술을 필요로 하는 DNA chip 과 micro total analysis system 등이 있다. 또한, 피부에 직접 붙여서 약물을 투여하는 시스템이나, 생체 신호를 측정하는 biosensors,

모세관이나 micro-capsule 등을 이용하여 약물을 투여하는 등의 drug delivery system 이 있고, Microfluidics, microelectrode 등을 응용한 인공 장기 또는 인공 보철물 분야와, microsensors, microactuators, microtools 등을 이용한 내시경과 같은 수술용 기구들이 있다.^[1]

본 논문에서는 이렇게 광범위한 응용분야 중, 의학 진단 분야, 특히 유전자 진단 분야에 응용될 DNA Chip, 그 중에서도 차세대 DNA 분석 시스템이라고 할 수 있는 Lab-on-a-chip system 의 개발 현황과 문제점, 향후 전망 등에 관하여 살펴보자 한다.

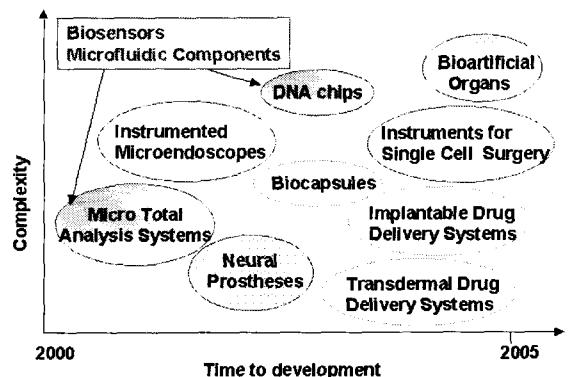


Fig. 1 MEMS in biomedical application (from^[1]).

* 삼성종합기술원, MEMS Lab.

Tel. 031-280-8179, Fax. 031-280-9357

Email limmem@sait.samsung.co.kr

산업자원부 지원 차세대 생물산업 핵심기술 개발 과제의 총괄 관리 책임을 맡고 있으며, BioMEMS Systems, 특히 DNA Lab-on-a-chip 분야에 관심을 두고 연구를 하고 있다.

Table. 1 Benefits of Miniaturization (from^{[2],[3]}).

Properties	Benefits	Explanation
Heat Transfer	Higher cooling and heating rates	Heat transfer rate is proportional to d^2 where d is the channel diameter. This allows higher driving voltages as heat is dissipated more efficiently.
Mass Transfer	More rapid diffusion across the channel	Effective diffusion time is proportional to d^2 Mixing is often performed by diffusion alone
Separation efficiency	Improved separation speed	Higher voltage gradient can be applied. Faster separation gives less diffusional band broadening
Reagent Consumption	Reduced reagent consumption	Require less material
Flow	Generally laminar	Reynolds numbers in microchannels are small, 1-200
Material Transport	Less external pumping and valving required	Electro-osmotic control of fluid motion allows valveless systems
Portability	Improved	Smaller system, no external device required
Parallelization	Readily achieved	Single chip with multi channels
Disposability	Improved	Single-use chips readily produced with low costs

2. Miniaturization

2.1 소형화의 장점

MEMS를 이용한 대량생산과 디바이스의 소형화는 여러가지 측면에서 큰 장점을 가진다. 먼저 디바이스 자체의 가격을 낮출 수 있을 뿐 아니라, 값비싼 시약 재료를 소량만 사용하여도 되므로 분석 비용과 시간을 줄일 수 있다. 그 외에도 Table 1에 나타낸 바와 같이 scale-down이 가져오는 여러 가지 장점들을 살리면, 디바이스의 성능까지 획기적으로 향상시킬 수가 있다.^[1-3]

예를 들면, 채널의 폭이 작을수록 열전도율이 좋아서, 온도 조절 속도가 훨씬 빠르다. 따라서, PCR과 같은 반응을 칩상에서 하게 되면 반응속도를 크게 향상시킬 수 있다. 또한, 전기 영동을 micro-scale 채널 내에서 하면 열전도도가 좋으므로, Joule Heating의 영향이 적어 기존의 전기 영동법 보다 훨씬 높은 전압을 사용할 수 있고, 이는 분석 속도의 향상을 의미한다. 분만 아니라, microstructure 내에서 유체는 주로 Laminar flow이므로 diffusion에 의한 band broadening이 줄어들어 분석의 resolution까지 크게 향상시킬 수가 있다.

Microsystem에서는 모세관압을 이용하거나, electro-osmotic flow 등을 이용하여 valveless system을 구현하는 것이 가능하다. 또한, multichannel을 이용하거나, 다양한 device를 하나의 칩 상에

integration하는 등의 방법을 사용하여 동시에 여러 가지 샘플을 분석할 수 있으므로, high throughput 분석에 큰 도움을 준다. 요약하면, MEMS 기술을 이용한 시스템의 소형화를 통하여 미량의 샘플 분석을 빠르고, 값싸고, 정확하게 할 수 있다는 장점이 있다.

3. DNA Chip Microarray

3.1 기본 원리 및 응용

DNA chip은 실리콘이나 유리 등의 고체 표면 위에 염기 서열을 알고 있는 DNA 분자(Probe)들을 고밀도로 고정시킨 것으로, 분석하고자 하는 유전자(Unknown sample)를 특정 DNA 염기 배열 정보를 가지고 있는 DNA 칩과 반응시켰을 때, 서로 간에 염기 서열의 짹이 맞으면 결합(Hybridization)하게 되므로, DNA chip 상의 어떤 위치에 염기 결합이 이루어지는지를 확인하면 샘플 유전자의 염기서열을 알 수 있다는 것이 그 기본 원리이다.

DNA chip을 사용하면 방대한 양의 유전 정보를 단시간 내에 동시에 분석 할 수 있을 뿐만 아니라, 유전자간의 상호 연관성까지 규명할 수 있게 되어, 앞으로 유전병 및 암의 진단, 돌연변이의 탐색, 병원균의 검출, 유전자 발현 분석, 신약 개발 등 꽤 넓은 응용분야가 예상된다. 또한 미생물

이나 환경오염의 감지기로 이용, 해독 물질에 대한 유전자를 찾아내어 유전자 재조합 기술을 적용함으로써 해독물질을 대량 생산하거나 의약용 농작물, 저 지방 함유 육류의 생산에도 응용될 수 있는 등 거의 대부분의 생물관련 산업에 혁명적인 발전을 가져올 수 있다.

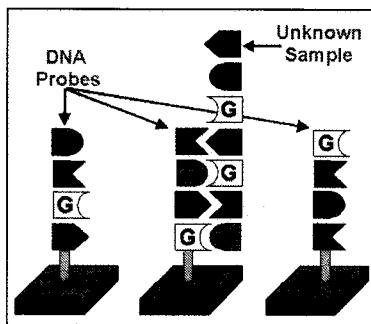


Fig. 2 Illustration of the hybridization reaction: Unknown sample DNA is hybridized to its matched sequence DNA probes which are immobilized on solid substrate.

3.2 Affymetrix GeneChip

DNA chip은 사용된 Probe의 종류에 따라 Oligo chip과 cDNA chip으로 구분하기도 하고, 제작된 방법에 따라 Photolithography chip과 pin spotting chip, inkjet spotting chip, electronic addressing DNA chip 등으로 분류하기도 한다.

DNA chip 분야의 선두주자라고 할 수 있는 Affymetrix는 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 photolithography 기술을 사용하여 수만개의 다른 염기들을 하나의 유리 위에서 직접 합성하여 chip을 제작한다. 유리의 표면은 각각의 염기들이 합성될 수 있게 linker가 붙어 있는데, 이들 linker 끝에는 빛에 의해 제거되는 화학 물질이 있다. 이러한 성질을 이용하여, photomask를 놓고 빛을 쬐면 빛을 받은 부분에 있는 화학 물질들만이 선택적으로 제거된다. 이렇게 말단의 화학 물질이 제거된 linker들은 염기를 만나면 결합한다. 다른 모양으로 설계된 photomask를 이용하여 위의 과정을 반복하여 oligonucleotide array를 제작한다.

Affymetrix는 이 기술을 사용하여 1.28 cm^2 안에 600,000 종류의 oligonucleotide가 심긴 칩을

만들 수 있으며(Fig. 4), 유전자 발현 검색용 칩뿐만 아니라 암 관련 유전자인 p53 와 BRCA1을 가진 칩, 에이즈의 원인인 HIV의 종류도 알 수 있는 칩 그리고 SNP (single nucleotide polymorphism) 측정용 chip 등을 생산하고 있다.

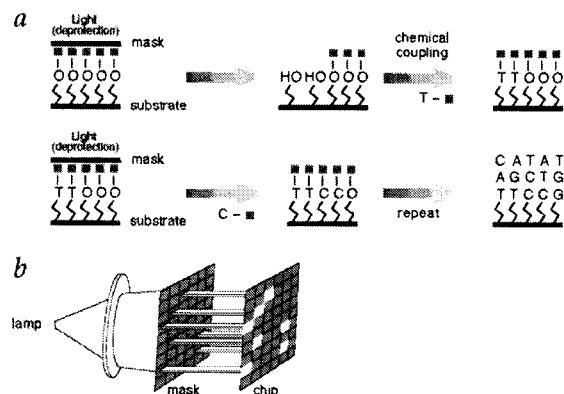


Fig. 3(a) Light directed oligonucleotide synthesis. A solid support is derivatized with covalent linker molecule terminated with a photolabile protecting group. Light is directed through a mask to deprotect and activate selected sites, and protected nucleotide couple to the activated sites. The process is repeated, activating different sets of sites and coupling different bases allowing arbitrary DNA probes to be constructed at each site.

Fig. 3(b) Schematic representation of lamp, mask, and array (from^[4]).

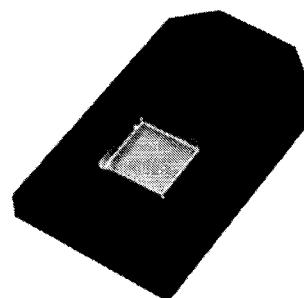


Fig. 4 Affymetrix Gene-Chips (from^[5]).

3.3 Micromachined Fluid Processor of the Affymetrix GeneChip

DNA chip을 사용하기 위해서는 chip에 액체 샘플을 넣고, 반응물과 혼합하는 등, chip 상에서 유체를 조절할 수 있어야 한다. 이를 위하여 마이크로 밸브나 펌프 등에 관한 많은 연구가 있으나, 대부분 micromachining과 bonding 기술을 이용한 기계적인 밸브나 펌프 디바이스인 경우가 많고, 이들은 앞서 언급한 간단한 형태인 DNA chip에 integration하기에는 디바이스의 제작 공정이 너무 복잡한 경우가 많다.

현재까지 유전자 분석 칩에 응용된 유체 조절은 대부분 밸브를 사용하지 않고, electroosmotic flow를 이용한 경우가 대부분이다. 이 방법은 전기장을 이용하여 액체 샘플을 이동하고, 혼합하는 방법인데, 이에 관해서는 다음 장에서 자세히 살펴보기로 하고, 여기서는 Affymetrix 사의 Anderson 등이 GeneChip에 사용한 방법인 압력을 이용한 방법에 대하여 살펴보자.^[6]

Hybridization chamber의 단면도(Fig. 5)와 fluid processor의 그림(Fig. 6)에 보인 바와 같이, Anderson 등은 별도의 복잡한 기계적인 밸브를 사용한 것이 아니라, 소수성의 막을 사용하고 압력을 조절함으로써 유체를 조절하였다. 이 칩은 폴리카보네이트 플라스틱(Polycarbonates plastics)을 injection molding 방법으로 만들었으며, 각 chamber의 끝은 소수성의 막과 vent가 있어 기체는 나갈 수 있고, 액체는 관 속에 머무르게 함으로써, 유체의 위치를 조절할 수 있었다. 또한 여러 개의 체적이 다른 chamber들을 연결하여 액체의 양을 측정할 수 있도록 하였다.

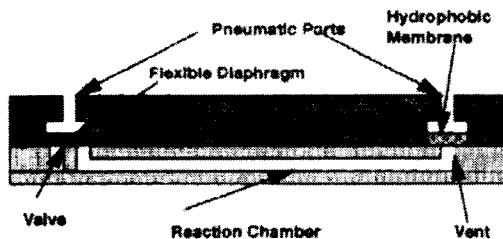


Fig. 5 Cross section diagram of the Affymetrix GeneChip reaction chamber having diaphragm valves and porous hydrophobic vents for sensorless fluid positioning. The lower wall of the reaction chamber is 40 to 250 μm thick for thermal addressing (from^[6]).

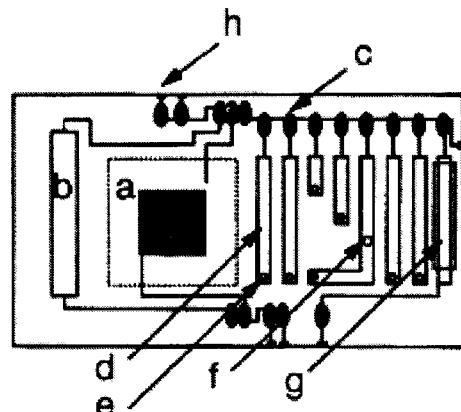


Fig. 6 Top view of integrated cartridge system (8.5 x 40 x 70mm) of Affymetrix fluid processing constructed using micromachining of flexible plastics. Elements include a) an oligonucleotide array and hybridization chamber, b) an auxiliary hybridization chamber, c) diaphragm valves, d) reagent chambers, e) hydrophobic vents, f) a linking chamber, g) an extraction outlet, and h) fluidic ports. Reaction chambers are 1.5 mm wide by 13mm long by 500 μm deep with 10 μL volume (from^[6]).

3.4 전기장을 이용한 DNA chips

Nanogen이라는 회사는 DNA가 (-) 전하를 띠는 성질을 이용하여 칩의 표면에 있는 특정 위치에 (+) 전기를 넣어서 그 위치에 원하는 유전자를 붙게 만드는 방법을 이용하여 DNA 칩을 개발하였다. 이 기술의 가장 큰 장점은 전기를 이용하여 샘플 DNA를 원하는 특정 위치에 끌어당김으로써 결합 시간을 단축할 수 있다는 것이다. 또한 반대의 전압을 걸어서 결합력이 약한 nonspecific binding이나 mismatch된 DNA 결합을 떼어냄으로써, 검출의 정확도를 향상 시킬 수 있었다.^[7-8]

Nanogen chip의 상세한 그림을 Fig. 7에 나타내었다. Chip은 25개의 백금 전극으로 구성된 array이며, 각 전극에 거는 전압을 조절하여 종류가 다른 DNA oligomer probe를 합성할 수 있다. Fig. 7(C)에 보인 바와 같이, Si substrate를 사용하였고, 그 위에 dielectric layer인 SiO_2 , Pt 전극, Si_3N_4 절연막과, streptavidin이 포함된 agarose로 된 permeation layer, 그리고 streptavidin에 잘 결합하는 biotin으로 modify된 DNA oligomer로 구성되어 있다.^[8]

여기서, agarose permeation layer는 금속 전극과 샘플 용액의 interface로서 (1) 인가된 전압을 유지하기 위하여 ion들을 걸러내는 역할, (2) DNA Probe를 붙이기 위한 matrix를 제공, (3) 전극과 수용액간의 접촉을 통한 전기화학 반응을 방지한다는 등의 매우 중요한 역할을 하고 있다.

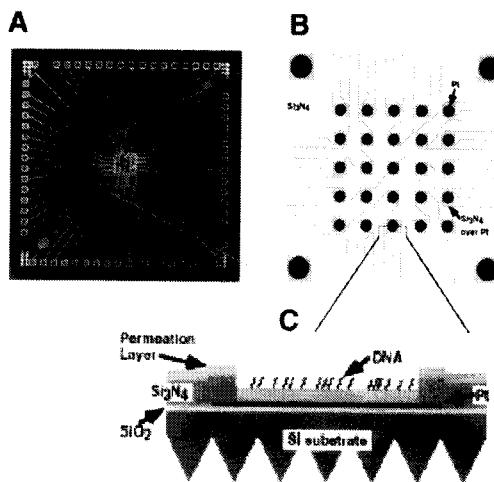


Fig. 7 (A) Overview of the microfabricated silicon chip with an array of electrodes. Chip dimension was 1cm square. Squares along the perimeter are exposed platinum contact electrodes for connection to power supply(from^[8]).

Fig. 7 (B) Electrode array region of the chip. The central 1X1 mm test site array region consists of 4 large(160 μm diameter) corner electrodes and 25 central 80 μm Pt electrodes(from^[8]).

Fig. 7 (C) Cross section of an electrode test site(from^[8]).

4. Lab-on-a-chip

4.1 Lab-on-a-chip

기존에 사용되고 있는 DNA microarray chip은 DNA의 결합 반응은 작은 칩 위에서 일어나지만, 유전자 분석을 위해서는 샘플을 추출, 증폭하는 장치 및 DNA의 결합 정도를 분석하기 위한 고가의 레이저 스캐너 등의 해석장치를 필요로 한다.

이에 반해, MEMS 기술을 이용하여 시료 희석, 혼합, 반응, 분리, 정량 등 모든 단계를 하나의 칩 위에서 모두 수행하도록 만든 것이 Lab-on-a-chip이다. 이렇게 MEMS 기술을 이용하여 microreactor

를 제작하면, 각 microreactor의 온도나 농도 등의 반응 조건을 개별적으로 조절하면서 다양한 화학 반응을 하나의 chip 상에서 수행함으로써, 기존의 DNA microarray 보다 훨씬 다양한 분야의 응용이 가능할 것이다.

이러한 칩은 그 자체로 사용할 수도 있고, Fig. 8에 개략적으로 그린 것처럼, 여러 개 칩을 하나의 board에 넣은 Fluid circuit board, 더 나아가 이를 쌓아서 하나의 mini-chemical factory로 만들도록, high throughput을 극대화 할 수도 있다.^[11]

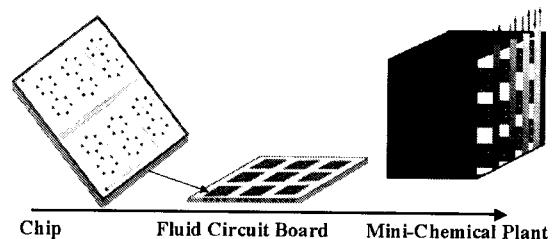


Fig. 8 Microreactors (left) can easily be combined to form small assemblies (middle) and even mini-chemical factories (right) (from^[11]).

Lab-on-a-chip의 핵심기술이라고 볼 수 있는 microfluidics 분야는 microchannels을 통하여 분석하고자 하는 물질을 이동하고, 반응시키고, 분리하는 등 여러 가지 분석 기능을 가능하게 하는 디바이스의 제작과 이러한 미세한 scale에서 나타나는 여러 가지 현상 규명에 관한 연구를 포함한다. Lab-on-a-chip의 요소 기술에 관하여는 최근에 많은 보고가 있는데, 여기서는 genomics 응용분야의 PCR (Polymerase Chain Reaction)과 electrophoresis를 Chip 상에서 실현한 예에 대하여 살펴 보자.

4.2 MicroPCR

PCR은 생명공학 역사상 가장 혁명적인 기술의 하나로서, Fig. 9에 개략적으로 나타낸 바와 같이, 증폭하고자 하는 DNA와 primer, 그리고, 열에 안정한 중합효소(polymerase)를 사용하고, 샘플의 온도를 올렸다 내렸다 하는 과정을 반복함으로써 DNA의 원하는 부분의 수를 증폭하는 기술이다.

PCR을 chip 상에서 하면, 2 장에서 살펴본 바와 같이 nanoliter volume의 시료만으로도 증폭이 가능

하므로, 값비싼 효소를 훨씬 적게 사용할 수 있어 시약 값을 절약할 수 있고, microchannel에서 열전도도가 좋다는 장점으로 인하여 단시간내에 온도 변화가 가능하므로, 반응 시간을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라, 추후 electrophoresis를 이용한 분석 시 분석 시간과 감도를 항상 시킬 수 있다.

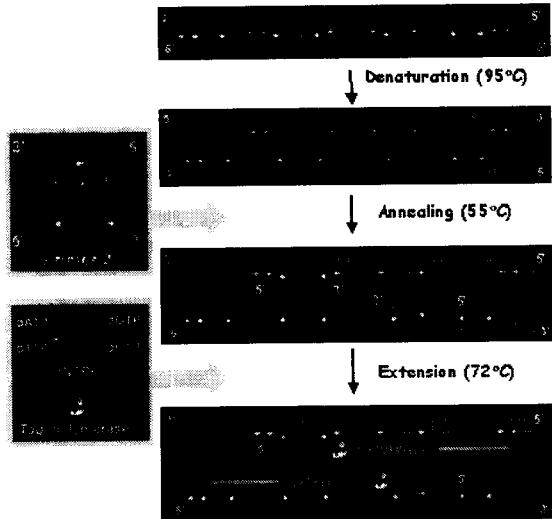


Fig. 9 A schematic diagram of the PCR

다양한 종류의 MicroPCR 시스템에 관한 연구 보고가 있으나^[12-15], 아직 microfluidics를 이용하고 전체의 분석과정이 모두 시스템화 된 chip은 보고되지 않고 있다. Northrup 등은 micromachined reaction chamber와 microheater를 사용하여 + 30°C /s 와 - 4°C /s의 속도로 온도 변화 주기를 40 회 반복하여 DNA 증폭을 10-15 분 안에 할 수 있는 microfabricated chip과, 이 chip의 DNA 증폭 정도를 실시간으로 볼 수 있는 광학 분석 장치를 포함하는 가방 크기의 DNA 분석 시스템을 제작하였다.^[12-13]

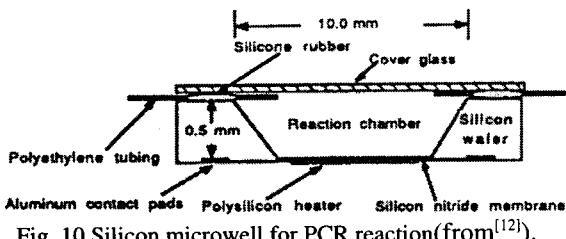


Fig. 10 Silicon microwell for PCR reaction (from^[12]).

Silicon microchamber에서 PCR을 할 때 chamber 표면의 물리/화학적 성질이 PCR의 성능에 큰 영향을 끼칠 수 있다. 특히, microscale에서는 표면적 대비 체적의 비율이 크므로, 표면의 영향이 상대적으로 더욱 중요하다. 표면에 Primer, 또는 중합 효소가 흡착하여 활성을 잃어 버리면 PCR의 수율이 떨어지므로, 표면의 화학 성질 변화에 대한 연구가 중요하다. Cheng 등은 100nm 두께를 가지는 thermal oxide 층을 입혔을 때, 결과가 가장 재현성 있었다고 보고하고 있다^[3,13]. 또는 기존의 PCR tube와 같은 재질인 polypropylene을 코팅한 표면도 좋은 결과를 주었다.^[13-14]

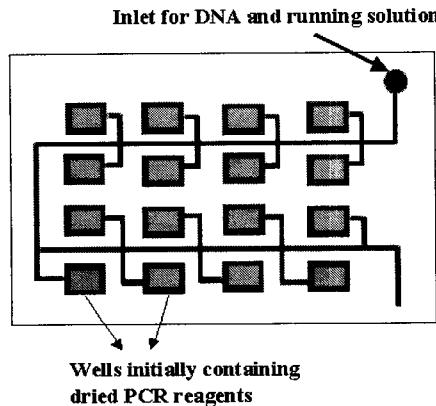


Fig. 11 A Schematic of a microchamber PCR system. In this case, the wells can initially contain primers, deoxynucleotides and polymerase. The system is then flooded with DNA and amplified. Having different primers in each of the well allows for different area of the DNA to be amplified (from^[3]).

Sanders 등은 microPCR의 각 chamber에 반응에 필요한 primer와 중합효소 등의 반응물을 미리 넣어 넣은 후 PCR을 하는 system을 제안하였다. (Fig. 11). Chamber마다 각기 다른 primer를 고정시킴으로써, DNA의 각기 다른 부분을 증폭시킬 수 있을 것이다.

이외에도, Fig. 12에 나타낸 바와 같이, Kopp 등은 Continuous flow PCR을 제작하였는데, 샘플이 관을 통하여 각기 다른 3개의 온도 구역을 흐르면서 melting, extension, annealing 과정을 반복하면서

서 증폭되도록 만들었고 반응시간을 5 배 이상 줄일 수 있었다.^[16]

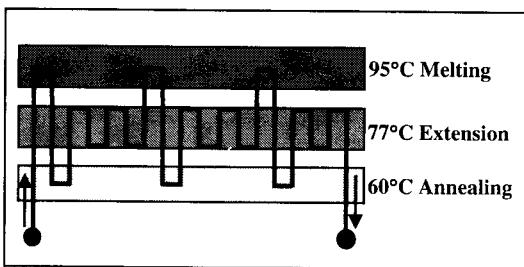


Fig. 12 A schematic of the continuous flow PCR on chip.

The sample is hydrostatically pumped through a single channel etched into a glass chip. The melting, annealing and extension steps are defined by the three temperature zones (from^[16]).

4.3 Electrophoresis chips

전기영동법은 현재까지 DNA 분석법의 기반이 되어왔으며, 2 장에서 언급한 바와 같이 channel size가 작아짐에 따른 여러 가지의 장점 때문에, 기존의 slab gel technology에서 capillary gel electrophoresis, 그리고, microfabricated chip을 이용한 electrophoresis 방향으로 발전되어 왔다.

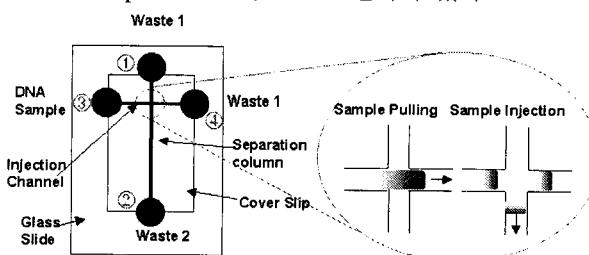


Fig. 13 Illustration of the microchip with a simple cross channel geometry.

Electrophoresis chip은 Glass나 silicon에 lithography와 etching 등의 기본적인 microfabrication 방법으로 제작한 microchannel에, 전기장을 걸어서 electroosmotic pumping 또는 electrophoretic separation 등을 이용하여 샘플을 이동 또는 분리한다.^[17-21]

일반적으로 Fig. 13의 (1)에서 (2)의 채널은

separation channel이고, (3)에서 (4)의 채널은 injection channel이다. 각 channel의 끝에는 샘플을 넣는 reservoir가 있고, channel은 polyacrylamide gel과 같은 완충액으로 채워져 있다. (3)과 (4)의 지점에 전압을 걸어 샘플을 십자로의 교차점으로 이동시키고, 다시 전압을 (1)과(2)의 점에 걸어서 샘플이 분리관으로 이동되도록 한다. 전기영동으로 분리한 후 결과는 일반적으로 Fig. 14에 예로 보인 바와 같이 confocal 형광 현미경을 사용하여 분석한다.

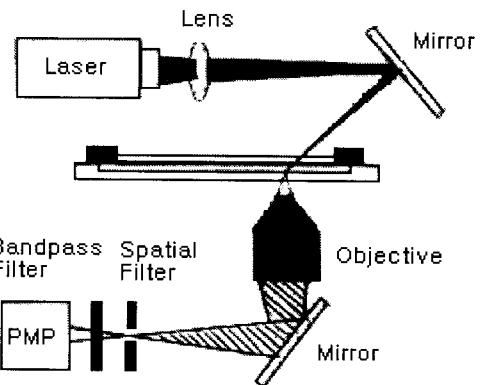


Fig. 14 Schematic of single-point detection system used in microchip electrophoresis (from^[17]).

Mathies 등은 96 multichannel을 가지는 chip을 이용하여 high throughput DNA 분석을 하는 chip을 제작하였고^[17-18], PCR과 electrophoresis를 하나의 chip 상에서 이루어지도록 integration 한 칩도 개발하였다.^[19]

유리나 실리콘 뿐만 아니라, 고분자 물질을 사용한 microdevice들도 제작되었는데, biocompatible하고, 투명하고, 화학물질이나 열에 안정된 플라스틱을 사용하면 접착성이거나 가공성이 뛰어나고, substrate 자체가 전기를 통하지 않기 때문에 전기 영동시 절연물질로 사용될 수 있다는 많은 장점이 있다.^[22-24]

또는 Fig. 15에 보인 바와 같이, 두 가지 물질의 장점을 살려 Plastic-on-Silicon device도 제작되었다^[22]. 플라스틱 모세관은 다음과 같은 plastic surface micromachining 공정을 거쳐 제작되었다. 먼저 두꺼운 sacrificial photoresist 위에 p-xylene을 vapor deposition으로 올린 다음, 필요한 구멍을 에

칭으로 뚫고, sacrificial resist는 아세톤에 녹여 없앤다. 이렇게 만들어진 모세관은 투명하고, 0.5 – 50 μm 깊이를 가진다. Fig. 15 (a)는 일반적인 CMOS circuit 위에 polyimide/p-xylene 모세관을 만들었을 때 사진이고, Fig. 15 (b)는 p-xylene 모세관의 단면을 보여준다.

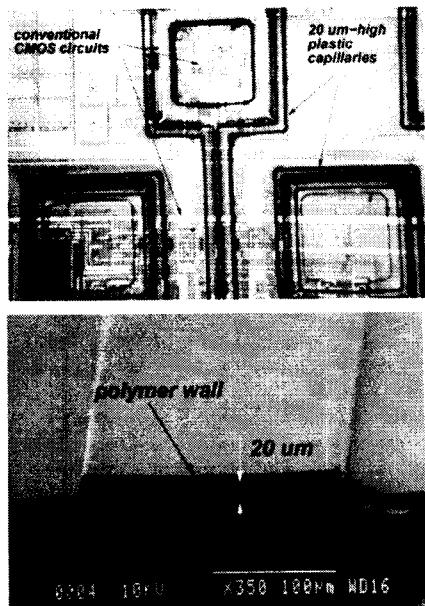


Fig. 15 (a) Top view of polyimide/p-xylene channels constructed on top of a CMOS circuit.

Fig. 15 (b) Cross section of a p-xylene polymer channel (from^[22]).

또한, Electrophoresis chip에 사용된 microchannel은 샘플을 이동시키거나, 반응, 분리, 희석하는 데도 많이 적용되었다. 그러나, ionic strength가 큰 샘플은 사용할 수 없다거나, microfabricated channel 물질과 샘플간의 interaction을 고려해야 하는 등의 여러 가지 제약이 있으므로, MEMS 기술을 이용한 valve나 pump 등의 개발도 중요하다.

Handique 등은 소수성 패턴이 있는 surface를 이용하여 유체를 원하는 곳에 고정시키고, 열에 의해 기포를 만들고 이를 적정량의 샘플을 주입하는 시스템을 제작하였다.^[23]

또한, Man 등은 다양한 플라스틱 공정을 사용하여 stop valve/injector (Fig. 16)를 제작하였다. 이 injector는 뾰족한 neck 부분에 의한 압력차로 유

체를 고정시킬 수 있다. 다음 Injection 하고자 할 때는, neck 바로 뒤에서 oxygen bubble을 형성시킨 후, 그 압력으로 유체를 injection 시킬 수 있다.^[24]

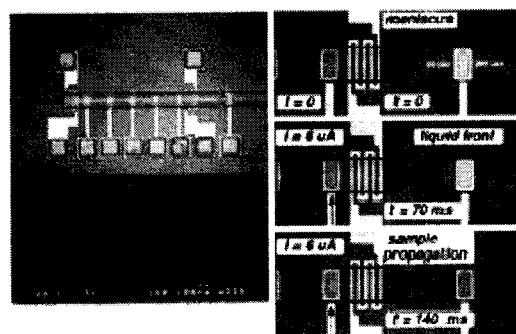


Fig. 16 (a) Example stop valve/injector implemented using plastics on silicon. The sharp lateral constriction forms a pressure barrier that stops the glow (b) The injector is activated by the formation of an oxygen bubble that overcomes the barrier re-establishing flow (from^[24]).

또한, Fig. 17에 혼합의 예를 보인 것처럼, 플라스틱 CD 위에서 원심분리, 희석, 밸브 등의 기능을 하는 “Lab CD”도 개발되었다.^[26] 이는 원심력과 microfabrication의 장점을 잘 살린 디자인이라고 볼 수 있다.

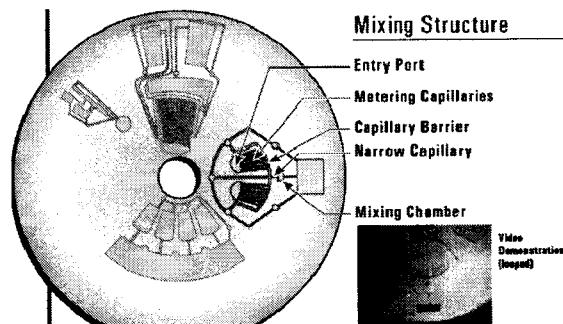


Fig. 17 Example of a mixing device fabricated in CD format (from^[26]).

4.4 DNA Sensors

기존의 DNA chip은 대부분 샘플 DNA에 형광 색소를 붙이고, 칩 위의 probe와 반응시킨 후 confocal microscope나 CCD camera를 사용하여 형

광물질을 광학적으로 검출한다. 그러나, 이러한 광학적인 검출법은 소형화가 어렵고, 디지털화된 출력을 볼 수 없기 때문에, 전기적인 신호로 결과를 낼 수 있는 새로운 검출법의 개발에 관하여 많은 연구가 진행 중이다.

Clinical Micro Sensor 를 비롯한 많은 연구 기관들이 산화/환원이 쉬운 금속 화합물을 이용하여 DNA hybridization 을 전기화학적인 방법으로 검출하는 방법에 관하여 연구하고 있다^[27-30]. DNA 가 Hybridization 되었을 때, 산화/환원이 쉬운 금속을 포함한 다른 화합물이 같이 complex 를 이루게 되고, 이를 전기화학적으로 검출하는 것이다. 이렇게 전기 신호를 내는 DNA sensor 를 이용하면, 기존의 고가의 커다란 장치가 필요없게 되어 Lab-on-a-chip 의 실현에 중요한 역할을 한다.

이외에도, 형광 색소나 다른 어떤 표식자를 사용하지 않고 분석하는 방법에 관하여도 연구가 활발히 진행 중인데, 스위스 IBM 연구소에서는 Fig. 18 에 나타낸 것과 같이 microfabricated 된 cantilever 를 이용하여 DNA oligomer probe 와 샘플 간의 문자간 결합력을 측정하는 방법으로 하나의 염기차이까지 분석할 수 있었다.^[31]



Fig. 18 Scanning electron micrograph of a section of a microfabricated silicon cantilever array (eight cantilevers, each 1 μm thick, 500 μm long, and 100 μm wide, with a pitch of 250 μm , spring constant 0.02 N/m; Micro and Nanomechanics group, IBM Zurich Research Laboratory, Switzerland) (from^[31]).

Chip 의 검출 감도를 향상시키기 위해서는 가능한 probe 의 surface density 를 증가시키는 것이 중요하다. 이를 위하여 여러 가지 다양한 시도가 있는데, 3 차원의 hydrogel pad 를 이용하는 방법^[32], dendrimer 를 이용하여 probe 와 형광물질의 밀도를

증가시키는 방법, 일정한 모양의 pore 로 구성된 glass substrate 를 사용하여 기공 표면에 probe 를 고정시키는 방법^[33] 등의 많은 새로운 시도가 있다.

그외에도, Optical fiber 를 이용한 microarray^[34], Quartz Crystal Microbalance 를 이용하여 결합 전후의 질량 차이를 측정하는 방법^[35], 그리고 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) mass spectrometry 를 이용하여 분석하는 방법^[36] 등이 개발되었다.

5. 결론

이상에서 최근 각광 받고 있는 DNA chip 과 차세대형 DNA chip 이라고 할 수 있는 Microfluidics 를 결합한 DNA Lab-on-a-chip 의 연구 현황에 대하여 알아보았다. 이 분야는 아직 태동기라고 할 수 있으며, 최근 국내에서도 KAIST, 포항공대, 한양대, 부산대 등의 학계와 여러 생명공학관련 벤처 기업들을 중심으로 DNA Chip 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 이는 앞으로, 이 분야가 21 세기 생물 산업 전반에 끼칠 커다란 파급효과를 생각할 때, 아주 고무적인 일이라고 볼 수 있다.

이러한 Lab-on-a-chip 이 실제로 genomics 나 medical diagnosis, 또는 미생물을 이용한 화합물 합성 등 생물화공 전반에 이용되기 위해서는 아직 그 요소기술의 개발과 시스템 차원의 integration 에 관한 연구가 필요하다. 이에 삼성 종합 기술원 MEMS Lab.에서는 차세대형 DNA Lab-on-a-chip 개발을 위하여 MEMS 기술을 이용하여 DNA 추출 및 증폭, 분석을 할 수 있는 chip 과 microfabricated biosensor 개발에 관한 연구를 수행하고 있다.

이렇게 소형화되고 시스템화된 chip 을 개발하기 위해서는 microfluidics, micromachining, surface chemistry, biology 등 다양한 분야의 기술협력을 통한 시너지 효과를 요구한다. 또한, Lab-on-a-chip 의 하드웨어는 DNA 뿐만 아니라, RNA, Protein, cell 또는 metabolites 등의 연구에도 응용될 수 있는 중요한 platform 을 제공하여 앞으로 post-genome 시대의 생명공학 발전에 커다란 기여를 할 것으로 기대된다.

후기

논문 편집에 도움을 주신 조윤정, 김영아 연구원에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Dario, P., Carrozza, M. C., Benvenuto, A., and Menciassi, A., "Micro-systems in Biomedical Applications," *J. Micromech. Microeng.*, Vol. 10, pp. 235-244, 2000.
2. Mastrangelo, C. H., Burns, M. A., and Burke, D. T., "Microfabricated Devices for Genetic Diagnostics," *Proceedings of the IEEE*, Vol. 86, pp. 1769-1787, 1998.
3. Sanders G. H. W., Manz A., "Chip-based Microsystems for Genomic and Proteomic Analysis," *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 19, pp. 364-378, 2000.
4. Lipshutz, R.J., Fodor, S.P.A., Gingras T.R., Lockhart, D.J., "High density synthetic oligonucleotide arrays," *nature genetics supplement*, Vol. 21, pp. 20-24, 1999.
5. <http://www.affymetrix.com/>
6. Anderson, R. C., Bogdan, G. J., Barniv, Z., Dawes T. D., Winkler J., Roy, K., "Microfluidic Biochemical Analysis System," *Transducers '97, International Conference on Solid-State Sensors and Actuators*, pp. 477-480, 1997.
7. Edman, C.F., Raymond, D. E., Wu, D. J., Tu, E. G., Sosnowski, R. G., Butler, W. F., Nerenberg, M., Heller, M. J., "Electric Field Directed Nucleic Acid Hybridization on Microchips," *Nucleic Acids Res.*, Vol. 25, pp. 4907-4914, 1998.
8. Sosnowski, R., Tu, E., Butler, W., O'Connell, J., and Heller, M., "Rapid Determination of Single Base Mismatch Mutations in DNA Hybrids by Direct Electric Field Control," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 94, pp. 1119-1123, 1997.
9. Figeys, D., Pinto D., "Lab-on-a-chip : A Revolution in Biological and Medical Sciences," *Analytical Chemistry*, Vol. 72, pp. 330A-335A, 2000.
10. Abramowitz S. "DNA Analysis in Microfabricated Formats," *J. of Biomedical Microdevices*, Vol. 1, pp. 107-112., 1999.
11. Service, R. F., "Miniaturization Puts Chemical Plants Where You Want Them," *Science*, Vol. 282, pp. 400-401, 1998.
12. Northrup, M. A., Ching, M. T., White, R. M., and Watson, R.T., "DNA amplification with a microfabricated reaction chamber," *IEEE Int. Conf. Solid-State Sens. Actuat.*, pp. 924-926, 1993.
13. Northrup M. A. "A miniature Analytical Instrument for Nucleic Acids Based on Micromachined Silicon Reaction Chambers," *Anal. Chem.*, Vol. 70, pp. 918-922, 1998.
14. Wilding, P., Shoffner M.A., and Kricka, L.J., "PCR in Silicon microstructure," *Clin. Chem.*, Vol. 40, pp. 1815-1919, 1994.
15. Taylor, T. B., Winn-Deen, E. S., Picozza, E., Woudenberg, T. M. and Albin, M., " Optimization of the performance of the polymerase Chain Reaction in Silicon-based Microstructures," *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, pp. 3164-3168, 1997.
16. Kopp D.U., Mello, A. J., Manz, A., "Chemical Amplification : Continuous-Flow PCR on a Chip," *Science*, Vol. 280, pp. 1046-1048
17. Cheng, J., Waters, L.C. Fortina, P., Hvichica, G., Jacobson, S.C., Ramsey, J.M., Kricka, L.J., and Wilding, P., "Degenerate Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoretic Analysis of Human DNA on Microchip-Based Devices," *Analytical Biochemistry*, Vol. 257, pp. 101-106, 1998.
18. Simpson, P.C., Roach, D., Woolley, A.T., Thorsen, T., Johnston, R., Sensabaugh, G. F., Mathies, R. A., "High-Throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 95, pp. 2256-2261, 1998.
19. Jacobson, S. C., Moore, A. W., and Ramsey, J. M., "Fused quartz substrates for microchip electrophoresis," *Anal. Chem.*, Vol. 67, pp. 2059-2063, 1995.
20. Woolley, A.T., Hadley, D., Landre, P., deMello, A.J., Mathies, R. A., and Northrup, M. A., "Functional Integration of PCR Amplification and Capillary Electrophoresis in a Microfabricated DNA Analysis Device," *Anal. Chem.*, Vol. 68, pp. 4081-4086, 1996.
21. Ibrahaim, M. S., Lofts, R. S., Jahrling, P.B., Henchal, E. A., Weedn, V. W., Northrup, M.A., and

- Belgrader, P., "Real-Time Microchip PCR for Detecting Single-Base Differences in Viral and Human DNA," *Anal. Chem.*, Vol. 70, pp. 2013-2017, 1998.
22. Man, P.F., Jones, D.K., Mastrangelo, C.H., "Microfluidic plastic capillaries on silicon substrates : a new inexpensive technology for bioanalysis chips," International Conference on Micro Electromechanical Systems (MEMS 97), pp. 311-316, 1997.
23. Handique, K., Gogoi, B. P., Burke, D. T., and Burns, M. A., "Microfluidic flow control using selective hydrophobic patterning," *Proc. SPIE Micromach. Conf.* Vol. 3224, pp. 1856-1899, 1997.
24. Webster, J. R. and Mastrangelo, C. H., "Large-Volume integrated capillary electrophoresis stage fabricated using micromachining of plastics on silicon substrates," *IEEE Int. Conf. Solid-State Sens. Actuat.*, pp. 503-506, 1997.
25. Man, P.F., Mastrangelo, C. H., Burns, A., and Burke, D. T., "Microfabricated capillary-driven stop valve and sample injector," International Conference on Micro Electromechanical Systems (MEMS 98), pp. 45-50, 1997.
26. <http://www.gamerabioscience.com/>
27. Steel, A.B., Herne, T.M., Tarlov, M.J., "Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold," *Anal. Chem.*, Vol. 70, pp. 4670-4677, 1998.
28. Kelley, S. O., Holmlin R. Erik, Stemp, E. D. A., Barton, J. K. "Photoinduced Electron Transfer in Ethidium-Modified DNA Duplexes : Dependence on Distance and Base Stacking," *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 119, pp. 9861-9870, 1997.
29. Hashimoto, K., Ito, K., Ishimori, Y., "Novel DNA Sensor for Electrochemical Gene Detection," *Analytica Chimica Acta*, Vol. 286, pp. 219-224, 1994.
30. Napier, M. E., Loomis, C. R., Sistare, M. F., Kim, J., Eckhardt, A. E., and T. Holden, "Probing Biomolecules Recognition with Electron Transfer : Electrochemical sensors for DNA Hybridization," *Bioconjugate Chem.*, Vol. 8, pp. 906-913, 1997.
31. Fritz J., Baller M.K., Lang H.P., Rothuizen, H., Vettiger P., Meyer E., J. Guntherodt, Ch. Gerber, J.K. Gimzewski, "Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics," *Science*, Vol. 288, pp. 316-318, 2000.
32. Proudnikov, D., Timofeev, E., and Mirzabekov, A., "Immobilization of DNA in Polyacrylamide Gel for the Manufacture of DNA and DNA-Oligonucleotide Microchips," *Analytical Biochemistry*, Vol. 259, pp. 34-41, 1998.
33. Steel, A., Torres, Matt, Hartwell, J. Yu, Y., Ting, N., Hoke, G., Yang, H., "The Flow-Thru Chip : A Three-Dimensional Biochip Platform," *Microarray Biochip Technology*, pp. 87-117, Edited by Mark Schena, ©2000 Bio Techniques Books, Natick, MA
34. Michael, K. L., Taylor, L.C., Schultz, S. L., Walt, D. R., "Randomly ordered addressable high-density Optical Sensor Arrays," *Anal. Chem.*, Vol. 70, pp. 1242-1248, 1998.
35. Okahata, Y., Kawase, M., Niikura, K., Ohtake, F., Furusawa, H., and Ebara, Y., "Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27 MHz Quartz Crystal Microbalance," *Anal. Chem.*, Vol. 70, pp. 1288-1296, 1998.
36. Little, D. P., Cornish, T. J., O'Donnell, M.J., Braun, A., Cotter, R. J., and Koster, Hubert, "MALDI on a chip: Analysis of Arrays of Low-Femtomole to Subfemtomole Quantities of Synthetic Oligonucleotides and DNA Diagnostic Products Dispensed by a Piezoelectric Pipet," *Anal. Chem.*, Vol. 69, pp. 4540-4546, 1997.