

생체물질 감지용 나노 감지 소자



김 태 송
(KIST 마이크로시스템 연구센터 책임연구원)



강 지 윤
(KIST 마이크로시스템 연구센터 선임연구원)

1. 서론

미국 NIH(National Institute of Health) 및 Celera사를 주축으로 한 인간게놈 유전자 콘소시움은 마이크로 어레이 프로젝트를 기획하여 인간 염색체 염기서열 초안을 공개하였으며 90% 이상의 유전정보가 밝혀졌다. 아직 완성되지는 않았지만 막대한 양의 유전정보 데이터베이스화를 기하고 있고 이를 바탕으로 포스트 지노믹스(post genomics)시대를 리드하는 바탕이 되고 있다. 이러한 노력으로 얻은 게놈의 구조(structural genomics)와 기능 정보들은 생명의 신비를 밝히는데 결정적인 도움을 줄 것이 틀림없으며 21세기 사회전반에 걸쳐 새로운 시대를 열게 만들 것이다. 그러나 유전자의 기능을 확실히 밝히기 위해서는 지금까지 쓰여진 대부분의 유전공학 방법들로는 많은 수의 유전자를 다루는 실험을 하는데 한계가 있고 생명현상이 대부분 단백질 수준에서 일어난다는 점을 고려할 때 post genome 시대에는 지금까지의 DNA 위주에서 이들의 기능을 밝히기 위한 새로운 기술의 개발이 절실히 요구된다. 이를 위해서는 유전체학(genomics), 단백질체학(proteomics), 생물정보학(bioinformatics) 등을 통하여 정보화 하여 유용할 수 있는 기틀을 마련하는 것이 매우 중요

하며, 이를 위하여 생명공학(BT)과 정보공학(IT)이 자연스럽게 결합되어 MEMS 베이스의 바이오 칩의 개발을 통하여 고속처리검색(high throughput screening)과 대량의 생명정보(massive bioinformatics) 처리의 가능성이 제시되고 있다. 여기에 Nanofluidics 소자 및 제어 기술, 기능성 나노 분자 혹은 자기 조립 기술, 나노감지막의 나노 패터닝 기술, 나노레벨 감지 기술 등 나노기술(NT)과 결합하여 극미량의 샘플로 고속, 정밀 처리 및 휴대 가능한 감지소자를 탑재한 fusion system으로의 개발이 필요하다. 이러한 극미량 샘플을 사용한 실시간 감지기능이 포함된 나노감지소자는 Point-of-care 진단을 가능하게 하여 특정 질병의 조기 발견을 통한 삶의 질 증대에 이바지 할 것으로 생각되며, 향후 대기 오염이나 수질 오염의 감시 및 감지를 위한 나노감지소자 분야로 확대 가능할 것이다.

본 글에서는 나노감지소자의 연구에 있어서 극미량의 질병 지표물질을 감지하기 위하여 모색되고 있는 방법중에 마이크로캔틸레버의 표면에 형성된 극미량의 생체물질에 의하여 발생한 기계적인 변화를 이용한 나노메카닉스 원리의 감지 방법과 나노 리터 이하의 극미량의 유량을 조절하여 생체물질을 감지하는데 응용하기 위한 연구를 소개하고자 한다.

2. 캔틸레버 나노 감지소자

최근 들어 나노기술(NT) 및 MEMS(Micro Electro Mechanical System) 기술, 그리고 바이오 기술(BT)에 대한 관심 및 연구가 크게 대두되고 있으며, 특히 나노 스케일의 감지가 가능한 소자에 대한 관심이 크게 증폭되고 있다.

이러한 기술은 불과 수 년 이내에 이루어진 기술이며, MEMS 공정 및 나노 기술, 그리고 표면 처리 기술의 발달을 통해 가능하게 되었다.

특히 실리콘 미세 가공 기술을 통해 캔틸레버를 제작한 후 biochemistry를 이용한 기능성 기(functionalized ligands)를 표면에 탑재한 나노 감지 소자에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.

이러한 나노 감지 소자는 임상적인 분석 뿐만 아니라 환경 감시 혹은 많은 산업 분야에 있어서 감지 소자로서 폭넓게 연구되고 있다.

또한 바이오 센서 또는 나노 감지소자의 경우 단일 단백질(protein) 또는 효소(enzyme)로부터 세포(cell)이나 마이크로 유기체(microorganism)까지 분석 가능하기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다.

특히 MEMS 기술을 이용한 마이크로 캔틸레버의 경우 수십 마이크로미터의 크기를 가지는 캔틸레버의 array화가 가능하며, 각각의 캔틸레버에 원하는 생체 물질의 specific binding 기술을 통해 각종 생체 물질 및 화학 물질의 감지가 가능한 장점을 가지고 있다.

이러한 나노감지소자의 경우 그 감지 방법 (detection method)에 따라 immuno 센서 또는 enzymatic 센서로 나뉘며 이를 측정하는 원리에 따라 amperometric, piezoresistive 혹은 piezoelectric 방법 등으로 나뉜다.

이러한 마이크로 캔틸레버를 이용하는 나노 감지 소자의 경우 센서 표면의 반응기들에 특정 생체 분자들의 흡착하는 특성에 의해 캔틸레버가 휘는 정도를 측정하는 법이 많이 연구되었다. 따라서 이러한 특성을 이용한 소자의 원리 및 특성에 대해 기술하기로 한다.

2.1 캔틸레버를 기반으로 하는 감지소자의 종류 및 측정원리

캔틸레버를 이용한 소자중 대표적인 것으로 AFM tip을 목적으로 한 마이크로 캔틸레버를 들 수 있으며[1], 이는 IC 기술을 기반으로 한 Si 가공 기술을 통해 제작된다. 이러한 MEMS 기반 기술을 통한 마이크로 캔틸레버의 제작 기술은 Si, SiNx, SiO₂의 가공 기술을 통해 다양한 형상과 크기의 마이크로 캔틸레버 제작을 가능하게 하였다.

마이크로 캔틸레버를 기반으로 하는 센서에는 크게 AFM force 센서, 온도 및 열을 감지하는 센서, 매질의 점탄성 정도 (medium viscoelasticity)를 측정하는 센서, 무게를 감지하

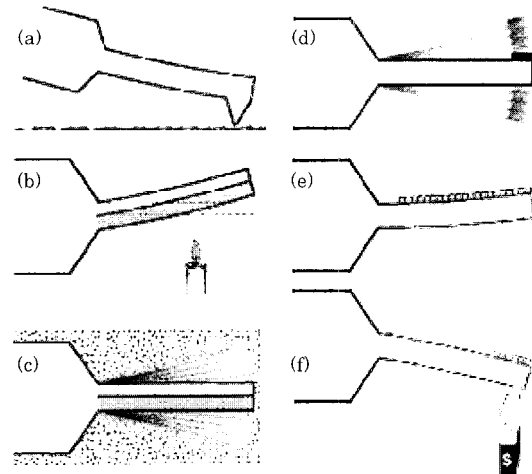


그림 1. 마이크로 캔틸레버를 기반으로 하는 트랜스듀서의 예 (a) AFM force 센서. (b) 온도, 열 센서. (c) medium viscoelasticity 센서. (d) 질량 센서. (e) stress 센서. (f) 캔틸레버 위의 magnetic bead를 이용한 센서.

는 mass 센서, 스트레스 감지 센서, 그리고 표면에 마그네틱 비드(bead)의 존재 여부를 감지하는 센서 등으로 나눌 수 있다(그림1)[2]. 또한 이러한 종류의 센서는 측정하고자 하는 요소에 따라 크게 두 가지로 나뉠 수 있다. 첫째 마이크로 캔틸레버의 표면에 원하는 생체 분자를 specific binding 시킨 후의 스트레스에 의한 bending을 optical한 방법으로 측정하는 법과 둘째 specific binding 전 후의 공진 특성 변화를 전기적으로 바로 측정하는 방법이다.

이러한 캔틸레버를 기반으로 하는 센서 위에서의 avidin-biotin binding, antigen-antibody interaction, 그리고 상보적인 DNA strand의 hybridization은 센서의 surface stress 및 surface tension의 변화 또는 공진 특성에 있어서의 변화를 가져오며, 이를 측정하면 결합한 생체 분자의 정량적 및 정성적 분석이 가능하게 된다.

2.2 측정요소에 따른 분류

2.2.1 공진주파수 변화에 따른 분석

캔틸레버 표면에서 생체 분자들의 흡착(adsorption) 또는 탈착(desorption)이 일어나는 경우 캔틸레버의 기계적 특성인 stiffness가 변하게 되며 이를 통해 매질의 점탄성 정도 (medium viscoelasticity) 및 무게 변화를 감지할 수 있다. 이론적으로 감지 가능한 mass density는 0.67ng/cm²이며, 최소 감지 가능한 무게는 10⁻¹⁵g으로 알려져 있다[3]. 그러나 이러한 원리를 이용한 감지법은 액체 속에서 공진 주파수 peak이 낮아지는 문제와 이에 따른 Q-factor의 감소 때문에 액체 속에서의 측정에 어려움이 따르며, 분자의 단원자 흡

착의 측정에는 적당하지 않다고 알려져 있다.

2.2.2 Surface Stress의 변화에 따른 Bending 측정법

Stoney 식에 따르면 surface stress에 의해 곡률 반경의 변화를 가져오게 되는데 생체분자의 켈틸레버 표면 흡착시에도 이에 상응하는 stress가 발생하게 된다. 이러한 측정 방법은 스트레스에 의한 켈틸레버의 휨을 PSD(position-sensitive detector)를 이용하여 photocurrent를 전기적 신호로 변환하여 측정하는 방법이다. 이러한 방법은 특히 IBM 추리히 연구소에서 활발히 진행중이며, static mode 하에서의 specific binding 시킨 켈틸레버 및 reference 켈틸레버의 변위차를 광

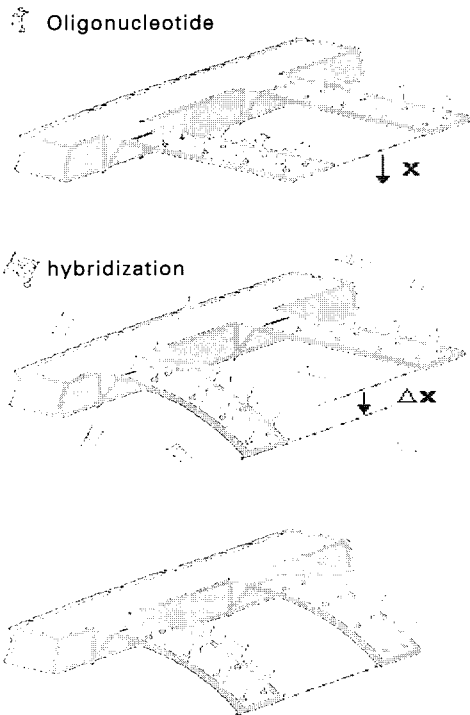
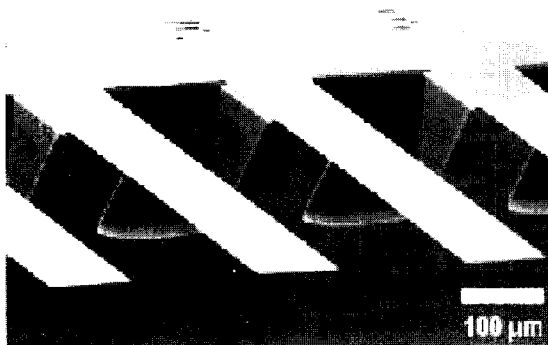


그림 2. 마이크로 켈틸레버를 이용한 DNA 의 분석의 예 (2).

학계를 이용하여 측정한 후 각각의 생체 분자들을 구분할 수 있음을 제시하였다(4).

2.3 나노감지소자의 연구동향 및 예시

2000년 Science지 (Science, 2000, v288, pp.316)에 단 일 엮기 서열 만이 다른 DNA 시퀀스를 분리할 수 있다는 내용의 논문이 IBM 추리히 연구소에 의해 발표됨으로서, 나노 감지 소자에 대한 관심이 크게 대두되었다. 이들은 stress에 의해 야기된 변위량의 차이를 광학계를 이용해 측정한 후 적 분하는 방법으로 DNA 16 mer 및 12 mer의 구별이 가능함을 보였으며, 농도에 따른 감지, protein-protein간의 구별, 그리고 Protein A 및 BSA의 구별 가능함을 제시하였다 (그림2).

또한 적혈구(RBC : red blood cell)의 모양을 결정 짓는 요 인중의 하나인 pH의 정량적 분석이 가능함을 제시하여 적혈 구의 형태를 감지할 수 있는 가능성을 제시하기도 하였다.

이러한 켈틸레버를 기반으로한 array 형태의 나노 감지 소 자를 통해 생체 물질의 감별 이외에 인공코(artificial nose) 의 개발로 응용할 수 있다. 예를 들면 센싱 켈틸레버로 Au/Si/SiO₂를 사용하고 reference 켈틸레버로 Au/Si/Au를 이용하여 기체상태의 습도를 측정할 수 있는 감지 소자, PMMA 기능성 기를 이용하여 향을 측정 할 수 있는 소자, PMMA층을 이용하여 알코올 계열을 감지할 수 있는 소자 등 이 개발되거나 연구 중에 있다. 또한 폴리머 기능기들을 이용 하여 펩시 콜라와 코카콜라의 분별 뿐 아니라 위스키의 종류 에 따른 분별까지도 가능한 감지 소자가 개발되거나 연구중에 있다.

3. 나노감지소자에서의 마이크로/나노플루이딕스

나노 감지소자를 이용하여 생체물질을 감지하기 위해서는 정밀한 마이크로/나노플루이딕스 기술을 이용해 정확한 양을 감지소자에 이송하여 효과적인 감지가 이루어지도록 하여야 한다. 바이오칩에 응용되는 기존의 마이크로 플루이딕스 기술 들은 제작재료나 제작기술, 이송, 분리, 검출 등이 있으며 이 에 대한 기술동향은 여러 논문에서 자세히 다루고 있다 (5)(6). 그러므로 여기서는 단백질 검출을 위한 마이크로 플 루이딕칩에 대해 주로 소개를 하도록 하고 향후 연구방향에 대해 논하도록 한다.

기존의 단백질 분석방법은 세포로부터의 추출, 분리, 2D-젤 (Gel) 전기영동을 이용한 감지, 질량분광계(mass spectrometry) 분석 등으로 이루어진다. 이러한 전통적인 방법은 시간 이 많이 걸리고 손이 많이 가는 실험이므로, 신속하고 높은 처 리량(throughput)을 가지면서 많은 샘플처리가 가능한 통합 시스템이 요구된다. 마이크로플루이딕 기술은 이러한 요구를

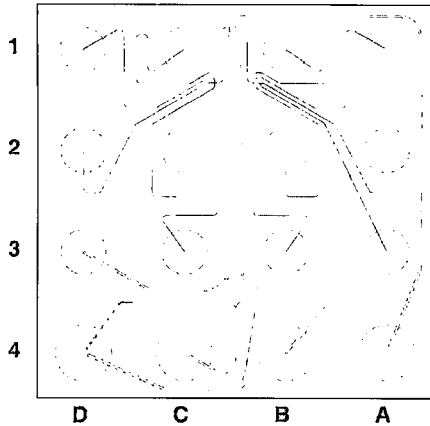


그림 3. 단백질 분리를 위한 Caliper 칩 (7).

만족시킬 수 있는 기술로서 부상하고 있으나 현재 개발된 단백질 해석 소자는 1D나 2D 젤 전기영동분리와 질량분광계를 결합한 형태가 대부분이다.

분리에 대한 대부분의 연구의 목표는 전통적인 2D-gel 전기영동(electrophoresis)을 칩상에 구현하고자 하는 연구를 수행하고 있다. 단백질이나 펩타이드의 전기영동 분리는 SDS(sodium dodecyl sulfate)나 자유영역에서 시도되었으며 많은 논문이 나와 있으며[5,7,8] Caliper에서는 이를 그림 3과 같은 형태로 이미 상용화한 바 있다[7]. 이런 마이크로칩들은 기존의 CE(Capillary Electrophoresis)보다 약 5배 이상 빠른 것으로 보고되고 있다. 세포로부터 단백질을 추출한 후 단백질 해석 전에 수행하는 단백질의 정제(purification)와 탈염(desalting)을 마이크로칩으로 구현한 것은 Gao[9]등에 의해 보고된 바 있으며 멤브레인층과 마이크로 폴리머 매니폴드를 결합하여 플라스틱 마이크로칩으로 구현하였다. 여러 기능을 통합하는 기술은 최근 마이크로플루이딕 시스템을 수직이나 수평으로 집적하고 있으며 Caliper에서는 분리, 착색-탈색(staining-destaining), 검출을 함께 하는 통합 단백질사이징(sizing) 칩을 발표한 바 있다[7]. 그러나 궁극적인 목표인 2D-IEF (isoelectric focusing)-SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)의 기능을 가진 완전한 플랫폼은 아직 보고된 바가 없다. 간단한 2D 해석에 대한 시도로 OCEC(Open channel electrochromatography)와 CE를 2차원으로 분석하는 유리칩이 제작되었으며[10] 또 다른 시도로는 그림 4와 같이 펩티드혼합물을 해석하기 위한 MEKC(micellar electrokinetic chromatography)와 CE를 동시에 수행하는 2차원 칩이 제작된 바 있다[11].

질량분광계(MS)는 단백질 해석에 있어 가장 흔하게 사용되므로 마이크로 플루이딕소자와 MS를 연결하고자 하는 많은 연구가 진행되어 왔다[12,13]. 이런 결합은 자동 샘플이송을

가능하게 하고 MS해석의 효율을 증대시키는 효과가 있다. 이러한 소자들은 해석하고자 하는 유체를 전기운동학(electrokinetic)방법이나 외부압력을 이동해서 구동하며 샘플처리와 검출이전에 분류(fractionation)을 행한다. 자동화된 MS 해석이 Ekstrom[14]등에 의해 제안되었으며 그림 5에 보듯이 enzyme칩, 샘플처리 로봇, 마이크로 dispenser가 통합되어 MS에 연결되는 구조를 가진다. Zhang[15]은 CE와 ESI-MS를 연결하는 시스템을 제안했으며 그림 6에서 보듯이 microwell plate에서 샘플을 자동채취하며 샘플을 로딩하는 부분, 분리채널, MS와의 인터페이스 부분을 칩에 구현하여 펩티드와 단백질의 해석을 성공적으로 수행하였다.

면역시험기(Immunoassay)에 대해서도 많은 연구가 이루어지고 있으며[12], 최근 Gottschlich[16]은 enzyme반응, 분리를 하나의 칩상에 구현하고 검출하기 직전에 분리된 펩티드에 라벨링을 하는 특징을 가지는 칩에 대해 보고한 바 있다.

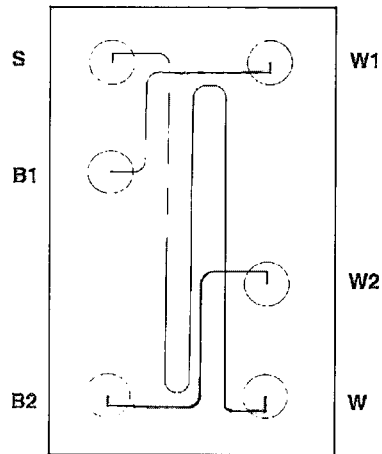


그림 4. MEKC와 CE를 2D로 분석하는 마이크로플루이딕 소자(7).

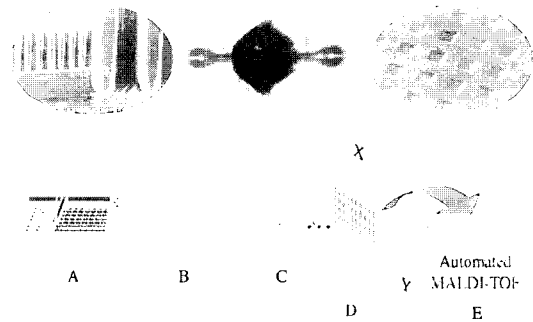


그림 5. 자동화된 질량분광계 시스템 : (A) 샘플 전처리 로봇 (B) 마이크로 칩 enzyme 반응기 (C) Microdispenser (피에조 구동) (D) 고밀도 nanovial plate (E) MALDI-TOF-MS 해석[10].

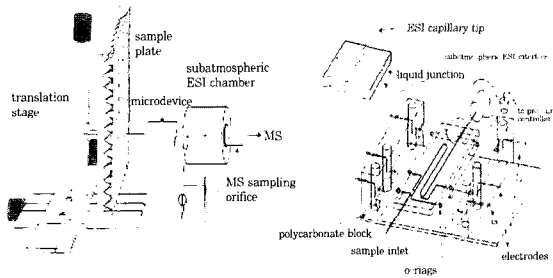


그림 6. 통합된 CE-ESI-MS 시스템과 마이크로 플루이딕칩.

단백질해석을 위한 마이크로칩은 분리에 대한 연구가 많이 되어 있고 상용화도 되어 있으나 궁극적 목표인 2D 해석을 위해서는 많은 노력이 필요하다. 그리고 질량분광계와 통합하는 연구는 더 많은 부분을 마이크로플루이딕 기술로 구현하여야 더 간단하고 신속하면서도 많은 처리량을 가지는 시스템이 가능할 것이다. 단백질은 DNA와는 달리 증폭방법이 없으므로 미량의 단백질을 검지하는 경우 나노감지소자의 검출감도를 향상시키는 방법과 병행하여 감지소자에 적합한 마이크로/나노플루이딕 칩에 대한 연구가 필요하다.

4. 향후 연구과제

이러한 나노 감지 소자의 가장 중요한 요소 기술로서는 첫째 나노 스케일의 감지가 가능한 시스템 및 프로토콜의 개발이며 둘째, 표면에 리셉터(receptor)를 강하게 결합시킬 수 있는 고정화 기술 (immobilization) 및 원하는 물질만 선택적으로 binding 하는 specific binding 기술이다.

현재까지 대부분의 캔틸레버를 기반으로 한 나노감지 소자의 경우, 광학 장비의 사용으로 그 분석 시스템 자체가 고가이며, portable한 시스템에서 그 측정이 불가능한 단점이 있다. 따라서 이를 극복하기 위한 방법으로 광학 장비를 사용하지 않고, 전기적인 신호로 직접 측정 가능한 acoustic 또는 mechanical 센서에 대한 연구가 진행중이다. 이러한 센서의 대표적인 종류로는 압전 소자 (piezoelectric sensor device) 및 압저항(piezoresistive sensor device) 방식이 연구되고 있으며, 이러한 나노 감지 소자의 개발은 LOC (lab-on-a-chip)의 탑재를 가능하게 하여 POC(point of care) 소자로서 제작 가능하다.

표면 고정화 기술의 경우, 현재까지 Au를 기반으로 한 thiol 기들의 binding 및 Si 기반을 기반으로 한 silane 기들에 대한 연구가 진행되었다. 이러한 단원자층 (mono layer) 을 기반으로 여기에 biotin-streptavidin interaction 및 antigen-antibody binding 등의 binding 기술로 표면 개질을 하게 된다. 이러한 기술들은 DNA의 분석을 가능하게 했

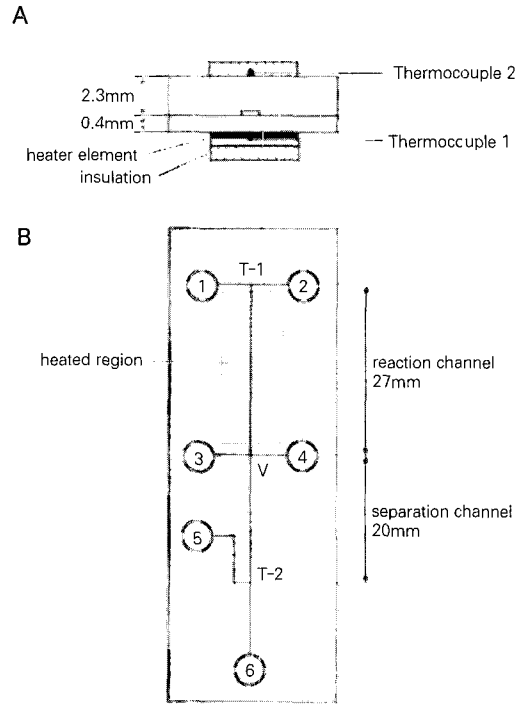


그림 7. Enzyme 반응과 분리를 함께 하는 Immunoassay.

며, 여러 단백질이나 살아있는 세포를 검지하는 수준에까지 이르렀다. 그러나 특정 단백질이나 세포의 경우 그 종류의 다양성으로 인해 각각의 목적에 따라 새로운 결합 물질 및 binding 기술이 요구된다. 따라서 이러한 specific binding 기술 및 immobilization 기술의 개발은 나노 감지 소자의 개발에 있어서 필수적이다. 또한 단백질과 같은 complex molecule에 있어서의 stress를 일으키는 요인인 흡착 물질간의 electrostatic interaction, 소수성 특성의 변화에 따른 예외 요인, 그리고 흡착물질의 구조 및 조성 변화를 막는 문제도 해결해야 할 과제이다.

참고 문헌

- [1] G. Binning, C. F. Quate, and C. Gerber, "Atomic force microscope", Phys. Rev. Lett., Vol. 56, p. 930, 1986.
- [2] R. Berger, "Micromechanical cantilevers : sensors for femtoscale science", Ph.D. thesis, Basel, 1997.
- [3] P. I. Oden, "Gravimetric sensing of metallic deposits using end loaded microfabricated beam structure", Sens. Actuators B, Vol. 53, p. 191,

- 1998.
- [4] H.P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, and H.-J. Guntherodt, "Translating biomolecular recognition into nanomechanics", *Science*, Vol. 288, p. 316, 2000.
- [5] Gerara Bruin, "Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices", *Electrophoresis*, Vol. 21, p. 3931, 2000.
- [6] Julia Khandurina, Andras Guttman, "Bioanalysis in microfluidic devices", *Journal of Chromatography A*, Vol. 943, p. 159, 2002.
- [7] Luc Bouse, Stephen Mouradian, et al, "Protein sizing on a microchip", *Analytical Chemistry*, Vol. 73, p. 1207, 2001.
- [8] Vladislav Dolnik, Shaorong Liu, Stevan Jovanovich "Capillary electrophoresis on microchip", *Electrophoresis*, Vol. 21, pp. 41, 2000.
- [9] Jun Gao, Jingdong Xu, Laurie E. Locascio, and Cheng S. Lee, "Integrated microfluidic system enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification", *Analytical Chemistry*, Vol. 73, p. 2648, 2001.
- [10] Norbert Gottschlich, Stephen C. Jacobson, Christopher T. Culbertson, and J. Michael Ramsey, "Two-dimensional electrochromatography/capillary electrophoresis on a microchip", Vol. 73, p. 2675, 2001.
- [11] Roy D. Rocklin, Roswitha S. Ramsey, and J. Michael Ramsey, "A Microfabricated fluidic device for performing two-dimensional liquid-phase separations", *Analytical Chemistry*, Vol. 72, p. 5244, 2000.
- [12] Daniel Figeys, Devanand Pinto, "Proteomics on a chip : promising developments", *Electrophoresis*, Vol. 22, p. 208, 2001.
- [13] Jenny Wen, Yuehe Lin, Fan Xiang, Dean W. Matson, Harold R. Udseth, Richard D. Smith, "Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization-mass spectrometry", *Electrophoresis*, Vol. 21, p. 191, 2000.
- [14] Simon Ekstrom, Patrik Onnerfjord, Johan Nilsson, Martin Bengtsson, Thomas Laurell, and Gyorgy Marko, "Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification", *Analytical Chemistry*, Vol. 72, p. 286, 2000.
- [15] Bailin Zhang, Frantisek Foret, and Barry L. Karger", High-throughput microfabricated CE/ESI-MS : automated sampling from a microwell plate", *Analytical Chemistry*, Vol. 73, p. 2675, 2001.
- [16] Norbert Gottschlich, Christopher T. Culbertson, Timothy E. McKnight, Stephen C. Jacobson and J. Michael Ramsey, "Integrated microchip-device for the digestion, separation and postcolumn labeling of proteins and peptides", *Journal of Chromatography B*, Vol. 745, p. 243, 2000.

저 자 약 력

성명 : 김 태 승

❖ **학 력**

- 1982년 연세대학교 세라믹공학과 공학사
- 1984년 한국과학기술연구원 재료공학과 공학석사
- 1993년 한국과학기술연구원 재료공학과 공학박사

❖ **경 력**

- 1994년 KIST 선임연구원
- 1997년 미국 미네소타대학 전기 및 컴퓨터공학과 Microtechnology lab Post Doc.
- 2000년 KIST 책임연구원, 마이크로시스템 연구 센터 센터장

성명 : 강 지 윤

❖ **학 력**

- 1990년 서울대 기계설계학과 공학사
- 1992년 서울대 대학원 기계설계학과 공학석사
- 1997년 서울대 대학원 기계설계학과 공학박사

❖ **경 력**

- 1997년 삼성종합기술원 전문연구원
- 2001년 KIST 선임연구원