

LAL 시험용 Lab-chip 개발을 위한 타당성 연구

황 상 언 · 최 호 진 · 서 창 우 · ¹안 유 민 · ²김 양 선 · † 이 은 규
한양대학교 화학공학과, 기계공학과, ¹마이크로바이오칩센터
(접수 : 2003. 8. 18. 게재승인 : 2003. 10. 26.)

Feasibility Study for a Lab-chip Development for LAL Test

Sang-Youn Hwang, Hyo-Jin Choi, Chang-Woo Suh, Yoo-Min Ahn¹, Yang-Sun Kim², and Eun Kyu Lee†
Department of Chemical Engineering,

¹Department of Mechanical Engineering, ²Microbiochip Center, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
(Received : 2003. 8. 18. Accepted : 2003. 10. 26.)

LAL (Limulus amoebocyte lysate) test to detect and quantify endotoxin is based on gelation reaction between endotoxin and LAL from a blood extract of *Limulus polyphemus*. The test is labor intensive requiring dedicated personnel, takes relatively long reaction time (approximately 1 hr), requires relatively large volume of samples and reagents, and its end-point detection method is rather subjective. To solve these problems, we attempted to develop a miniaturized LOC (lab-on-a-chip) prototype using PDMS and glass. Using the 62 mm (length) × 18 mm (width) prototype in which 2 mm (width) × 44.34 mm (length) × 100 μm (depth) microfluidic channel was provided, we compared the various detection methods of gelation, turbidometric, and chromogenic assays to find the chromogenic method to be the most suitable for small volume assay. In this assay, kinetic point method was more accurate than end point method. We also found the PDMS chip thickness should be minimized to around 2 mm to allow sufficient light transmittance, which necessitated a glass slide bonding for chip rigidity. Through the miniaturization, the test time was reduced from 1 hr to less than 10 minutes, and the sample volume could be reduced from 100 μl to 4.4 μl. In sum, this study revealed that the mini LOC could be an alternative for a semi-automated and reliable method for LAL test.

Key Words : LAL test, endotoxin, Lab-on-a-chip, PDMS, kinetic chromogenic assay, microfluidic chip

서 론

최근 생명공학에 관한 연구 중에 미세유체소자 (microfluidics chip)를 이용한 분석기술의 연구가 발표되고 있다. 특히 미세유체소자는 적은 양의 시료만으로 빠른 시간에 여러 가지의 진단과 검사를 간편하게 수행할 수 있다는 장점 때문에 차세대 분석 시스템으로 각광을 받고 있다(1). 미세유체소자는 주로 반도체 제작 공정을 응용하여 제작되는데 이러한 공정으로는 대표적으로 surface micromachining과 bulk micromachining이 있으며 일괄처리 공정과 대량생산이 유리하다는 장점이 있다. 재료로는 반도체 제작 공정에서 일반적으로 쓰이는 실리콘 기판은 불투명하고 생화학 시료에 적합하지 않아 생화학 시료와 반응성이 적고 투명하며 실리콘과

유사한 물성을 갖는 유리가 미세유체소자의 재료로 많이 사용된다. 하지만 유리는 가공이 어렵고 재료의 가격과 가공 비용이 비싸다는 단점이 있다. 이러한 실리콘과 유리의 단점을 극복하기 위하여 다양한 폴리머 소재들이 개발되고 대량 생산을 위해 REM (replica molding), μTM (micro transfer molding), MIMIC (micro molding in capillaries)와 hot embossing 등의 방식이 도입되었다(2). 특히 값싸고 다양한 방법으로 쉽게 가공할 수 있고 독성이 없는 PDMS (polydimethylsiloxane)를 사용하여 molding 기법으로 미세유체소자를 제작하고 있다(3). 미세유체에 기초한 lab-on-a-chip (LOC)는 시료의 전처리, 반응, 검출, 분석 등을 chip 상에서 연속적으로 수행 가능하도록 만든 장치이다. LOC를 사용할 때의 장점은 분석시간이 수분 또는 수초로 단축되고 사용되는 시료의 양도 μl 단위 이하로 줄일 수 있으며 다수의 시료에 대한 동시 분석이 가능하게 된다(4).

Endotoxin은 일반적으로 그람 음성 박테리아의 세포 외벽에 존재하는 물질로 박테리아가 살아있는 동안에는 발현되지 않지만 박테리아가 증식하거나 사멸할 때 세포의 벽이 깨지면서 외부로 방출된다(5). LAL (Limulus Amoebocyte Lysate)

† Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea.

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

은 아메리카 대륙의 대서양 연안에 분포하는 투구게 (*Limulus polyphemus*)의 순환혈액세포의 추출물로 endotoxin과 만나게 되면 겔을 형성하는 반응을 일으킨다(6). Endotoxin 시험법 (LAL test)은 endotoxin이 LAL을 활성화 시켜 겔화를 일으키는 반응에 기초해 endotoxin을 검출 또는 정량하는 방법으로 서(7) 의약품 생산에 사용되는 물, 주사용수, 원료의약품, 의 료용구 등에 함유된 endotoxin을 검출하는데 사용된다(8). Endotoxin의 측정 방법에는 겔 형성을 지표화 하는 겔화법 (gel clot), 비탁법 (KTA: kinetic turbidimetric assay), 또는 비 색법 (KCA: kinetic chromogenic assay)이 있다. 겔화법은 LAL 중에 존재하는 endotoxin 감소성의 각종 응고인자에 의 해 순차 활성화되고 최종적으로 활성화된 응고효소에 의해 coagulogen이 coagulin으로 변환되어 겔을 형성한다(Fig. 1).

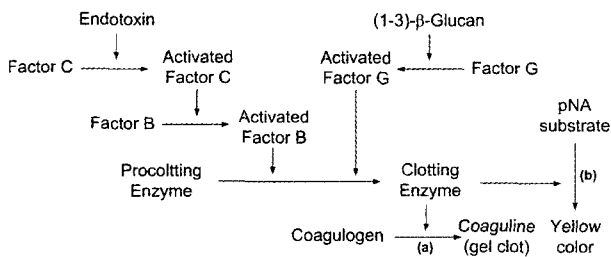


Figure 1. Principle of the LAL assay. Endotoxin activates the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) pro-enzyme resulting in gel formation (11). (a) gel clot and kinetic turbidimetric assay, (b) kinetic chromogenic assay. pNA substrate is Boc-Leu-Gly-Arg-CONH-para-nitroaniline.

비탁법은 endotoxin과 LAL이 반응해 최종적으로 활성화된 응고효소에 의해 coagulogen이 coagulin으로 겔화할 때에 발생하는 탁도 변화를 340 nm에서 광학분석장치에 의해 측정하는 방법이다(9). 비색법은 합성 chromogenic peptide가 coagulogen을 대체한다(10). 이 방법은 incubation 후 발색 정도를 405 nm에서 측정한다. 비색법에서는 효소반응의 활성화의 결과는 발생 기질의 방출과 노란색의 형성이다(Fig. 1(b)). 발색의 정도는 엔도톡신의 양에 비례한다.

기존의 endotoxin 시험법은 한 시간 동안의 반응을 요구한다(11). 기존의 분석법은 시료 100 μ l에 LAL 용액 100 μ l가 필요하다. 그러나 치료용 단백질 등 희귀시료에 대한 endotoxin의 시험에서 분석시료의 부피는 작을수록 좋다. LAL 시험용 LOC는 측정의 정확성 뿐만 아니라 경제적 대량 생산이 가능하여야 한다. 따라서 우리는 값싸고 제작이 용이하며 또한 대량생산이 가능한 PDMS를 사용한 칩을 제작하고자 하였다. 특히 PDMS는 mold를 이용하여 찍어내는 방식이 가능하고 channel을 쉽게 만들 수 있기 때문에 일회용 chip으로 만들어져 판매될 경우 상업성이 있다.

따라서 우리는 짧은 시간에 다중 시료의 endotoxin 측정이 가능한 LOC를 이용한 endotoxin 측정법을 개발하고자 하였다. LOC 개발을 위한 타당성 실험을 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 첫째, LAL chip 상에서의 최적의 검출방법을 결정하는 것으로 비탁법과 비색법으로 시험하여 더 나은 방식을 결정하고자 하였다. 둘째, chip의 장점인 적은 시료의 사용을 실현하기 위해서 시료부피를 감소시켜 가면서 측정

가능한 최소 유효부피를 찾자 하였다. 셋째, 일회용 LOC를 설계하고 제작하여 chip 상에서 LAL 시험을 수행하여 정확성과 재현성을 확인하였다.

재료 및 방법

재료

LAL 시험용 시약은 endotoxin과 반응시 겔을 형성하는 LAL의 표준곡선을 작성하기 위하여 사용되는 CSE (control standard endotoxin), 0.001 EU/ml 이하의 endotoxin을 함유하는 용액으로 CSE와 LAL 용해시에 사용되어지는 LRW (LAL reagent water)로 구성되어 있으며 시험에 사용된 모든 초자류와 기기는 endotoxin이 없는 제품을 사용하였다. LAL 테스트용 시약은 겔화법, 비탁법 그리고 비색법을 사용하였고 이는 모두 Endosafe (USA)사에서 구입하였다. 모든 테스트는 37 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 수행하였으며 탁도와 비색의 변화를 측정하기 위하여 ELISA reader (Power Wave x340, BIO-TEC Instruments Inc., USA)와 96 well plate를 사용하였다.

엔도톡신 측정방법

LAL 측정은 LAL 시약과 시료를 100 μ l씩 넣은 후 1시간 동안 교반 없이 37 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 반응하여 겔형성 여부를 판단한다. 이러한 LAL 시험법의 정밀도 및 유효성을 보증하기 위하여 한도시험법을 선행하여 LAL 시약의 표시감도를 확인하고 검체가 반응을 촉진 또는 저해하지 않는 것을 확인하였다(12). 한도시험은 음성대조 (negative control), 양성대조 (positive control), 제품양성대조 (positive product control), 제품음성대조 (negative product control)로 이루어져 있으며 각각 2회 반복 시험한다. 음성대조는 LAL 시약에 검액의 희석이나 endotoxin 표준액을 만드는데 사용된 LRW의 오염여부를 판단하는 시험이다. 양성대조는 음성대조의 반응간섭인과 시약의 감도를 확인하는 시험이다. LRW에 사용하는 시약 감도의 2배에 해당하는 endotoxin 표준액을 넣어 시험한다. 양성제품대조와 음성제품대조는 본 실험에서는 생략하였다. 한도시험 후 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 10 EU/ml의 CSE를 이용하여 endotoxin에 대한 표준곡선을 만든다. 정량분석을 위한 LAL 시험법에는 비색법과 비탁법을 이용하며 표준 곡선의 작성시 end point 방법과 kinetic point 방법을 이용한다(13). End point 방법은 CSE의 농도에 따라서 정해진 시간이 경과한 후 발색도를 405 nm에서 측정하는 방법이고, kinetic point 방법은 405 nm에서 일정한 optical density에 도달하는 시간을 측정하는 방법이다.

PDMS chip 제작

PDMS LOC의 제작은 반도체 제조공정을 응용하여 mold를 제작하고 PDMS를 부어 미세유체소자를 만든 후 유리에 붙여 제작하였다(3). 먼저 mold 제작을 위해서 일반적으로 photolithography 공정에 쓰이는 quartz mask와 저렴한 film mask를 제작하였다. 실리콘 기판 위에 negative-photoresist인 SU-8 (NANOTM, SU-8, MICROCHEM, USA)을 100 μ m의 두께로 spin coating을 하였다(Fig. 2(a)). Coating된 photoresister에 함유되어 있는 솔벤트를 제거하기 위해서 65 $^{\circ}$ C에서 10분

간 가열 후 96°C에서 30분간 가열했다. 그리고 photolithography 공정을 이용하여 구조물을 만들어 mold를 제작하였다(Fig. 2(b)). Replica를 제작하기 위해 PDMS (SYLGARD184, Dow Corning, USA)를 경화제와 10대1로 혼합하여 mold에 부었다(Fig. 2(c)). PDMS와 경화제의 혼합과정에서 생성된 기포를 제거하기 위해서 진공오븐에 넣어 1시간 동안 진공상태를 유지하였다. 이 혼합물을 항온항습기 (MTH2200, SANYO, Japan)에서 65°C로 4시간 가열하면 경화가 된다. PDMS replica를 oven에서 꺼내어 mold에서 분리하고(Fig. 2(d)) punch로 tubing을 위한 hole을 가공했다(Fig. 2(e)). Pyrex slide glass와 접착하기 위해서 RIE (reactive ion etching) 장비에서 O₂ plasma로 replica의 표면처리를 하였다(Fig. 2(f)). 그런 후에 시료주입 튜브를 삽입하여 고정시켰다.

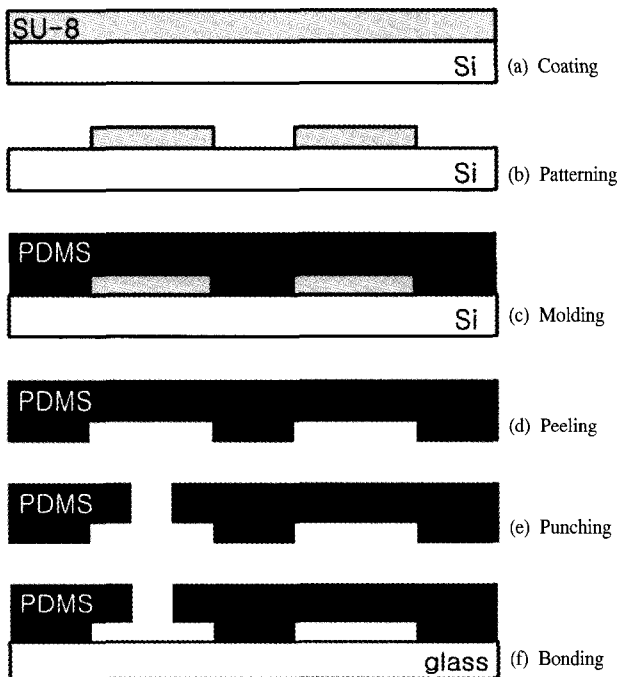


Figure 2. Fabrication process of PDMS microchip.

결과 및 고찰

LAL 측정방법의 결정

LAL 측정법에 사용되는 겔화법, 비탁법과 비색법 중 칩에서 사용가능한 방법을 찾기 위해서 낮은 CSE 농도와 작은 부피에서 비교하였다. 칩에서는 겔화법으로 뒤집어서 흘러내리는지 아닌지의 여부를 판별할 수 없기 때문에 본 실험에서는 겔화법은 배제하였다. On-chip 측정은 매우 낮은 부피에서 저농도의 endotoxin의 검출이 필요하기 때문에 0.05-0.06 EU/ml의 CSE 농도와 50 µl의 부피에서 변화정도를 측정하였다. 처음 5분간은 비탁법이나 비색법의 변화가 비슷하였으나 10분 이후부터는 비색법의 발색도가 급격히 증가하여 60분 후 비탁법은 340 nm에서 0.05의 흡광도를 보이나 비색법은 405 nm에서 0.52의 흡광도를 보인다. 따라서 저농도의

CSE와 적은 부피에서의 측정법으로는 비색법이 약 10배 높은 감도를 나타내어 비탁법에 비하여 더 우수함을 알 수 있었다. 따라서 앞으로의 모든 측정은 비색법으로 진행하였다.

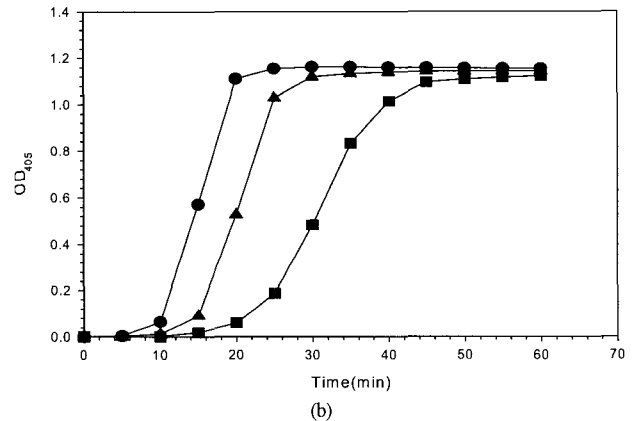
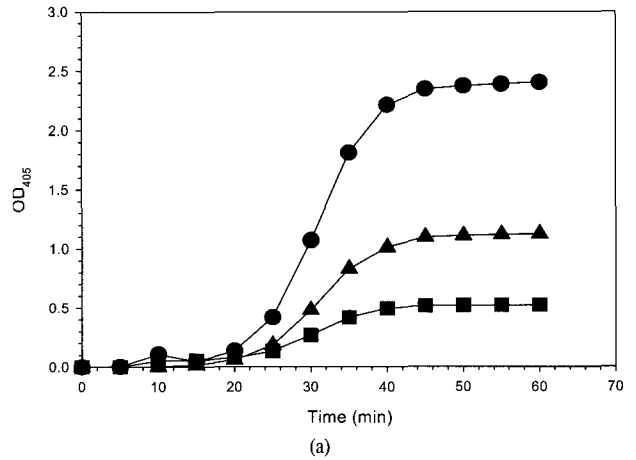


Figure 3. (a) Effect of reaction volume with 0.05 EU/ml CSE, 50 µl (■), 100 µl(▲), 200 µl(●) on KCA result, (b) Effect of endotoxin concentration on KCA with 50 µl. 0.05(■), 0.5(▲), 5(●) EU/ml CSE.

Table 1. Relation between volume and optical density per unit depth

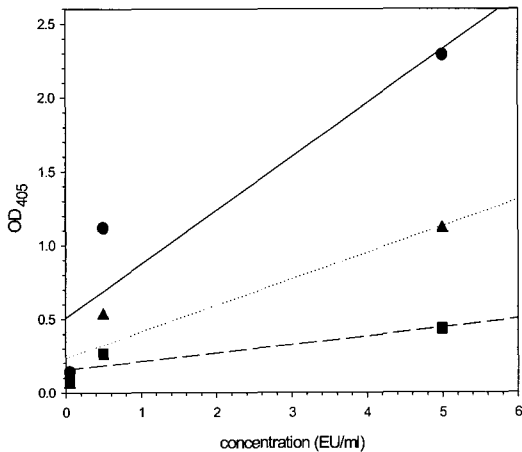
Volume (µl)	OD _{405nm} (-)	Depth (mm)	OD/Depth (mm ⁻¹)
50	0.523	1.0	0.52
100	1.123	2.5	0.45
200	2.404	5.0	0.48

비색법에서의 부피감소가 측정결과에 미치는 영향

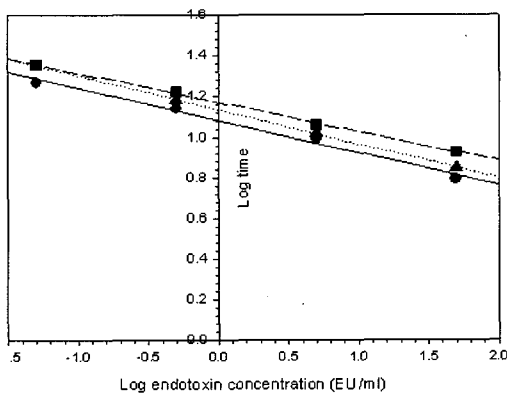
LAL test를 LOC에서 구현하기 위해서 시료의 부피 감소가 측정법에 미치는 영향을 확인하였다. 200 µl에서부터 50 µl까지 부피를 감소시켜 변화를 살펴본 결과 50 µl까지는 동일한 양상을 나타내었다(Fig. 3(a)). 모두 50분 이후에 겔화반응이 완료됨을 알 수 있다. 부피가 감소함에 따라 흡광도 값도 감소하였으나 이는 측정기구인 96 well plate의 각 well의 지름이 일정한데 비하여 부피의 감소 때문에 실제적으로는 시료의 높이가 감소된 것에 따른 것이었다. 이를 확인하기 위하여 측정된 흡광도 값을 시료의 높이로 나누어 보았더니 부피의 변화에 따라 무관함을 보여 주었다(Table 1). 즉 같은 CSE의 농도에서는 부피의 변화에 무관하게 같은 LAL 반응

이 일어난다는 것을 확인하였다. 따라서 On-chip 측정시 유로를 조절하여 시료의 부피에 무관하게 투과 깊이를 일정하게 유지하는 것이 중요한 부분임을 알 수 있다.

50 μ l의 부피일 때 0.05, 0.5, 5 EU/ml의 CSE 농도에 대해서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다(Fig. 3(b)). CSE의 농도에 따라서 흡광도 값의 변화는 초기에는 큰 차이를 보이나 50분 이후에는 모두 비슷한 값을 갖는 것을 알 수 있다. 따라서 표준곡선을 작성하기 위하여 end point 방법과 kinetic point 방법을 사용하여 비교하였다. End point 방법은 각 CSE의 농도에 따른 변화량을 확연히 구별이 가능한 20분에서의 흡광도 값을 사용하였고 kinetic point 방법에서는 0.1 흡광도의 변화를 나타내는 시간을 이용하였다. Fig. 4에서 end point 방법은 직선상관계수가 평균 0.84로 정확성이 떨어지나 kinetic point 방법을 이용한 분석에서는 직선상관계수가 평균 0.99 이상으로 높은 정확성을 보여주고 있다. 표준곡선은 식품의약품안전청의 기준인 직선상관계수 (r^2)가 0.98 이상이어야 한다는 기준에 따라 end point 방법보다는 kinetic point 방법이 더욱 적합하다고 판단되었다(11, 12).



(a)



(b)

Figure 4. Standard curve on KCA. 50 μ l(■), 100 μ l(▲), 200 μ l(●). (a) On set time (end point method). Correlation coefficient(r^2) is lower than 0.98, (b) On set OD₄₀₅ (kinetic point method), r^2 is higher than 0.98.

PDMS를 이용한 LOC의 제작

PDMS는 가공이 쉽고 값이 싸다는 잇점은 있지만 PDMS 자체가 UV를 흡광하는 성질이 있기 때문에 흡광도의 변화를 정확히 측정하는데 어려움이 있다. 따라서 우리는 PDMS의 두께에 따른 405 nm에서의 투과도를 측정하여 최적의 두께를 결정하고자 하였다. PDMS의 두께가 4 mm 이하에서 80% 이상의 투과도를 보여주며 두께가 얇아질수록 투과도는 증가함을 알 수 있다(Fig. 5). 그러나 PDMS는 강도가 매우 약하여서 두께가 얇아질수록 휘거나 찢어지는 문제가 발생하였다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 우리는 2 mm 두께의 PDMS를 현미경용 슬라이드 글라스에 접합하여 사용하였다. 또한 대량생산을 위하여 mold를 제작하였다(Fig. 6(a)). LAL 측정을 위한 chip은 기초 실험을 위하여 일자 형태로 하였으며 앞에 시료를 주입할 수 있는 부분과 뒷부분에 색상의 변화를 측정할 수 있는 부분으로 만들었다(Fig. 6(b)). 일자형 chip은 길이는 62 mm이고 폭은 18 mm이다. 유로의 폭, 길이, 깊이는 각각 2 mm, 44.34 mm, 100 μ m이다.

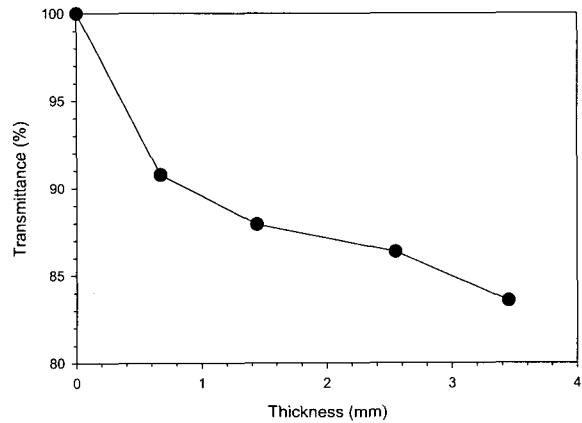


Figure 5. Relation between PDMS chip thickness and light transmittance.

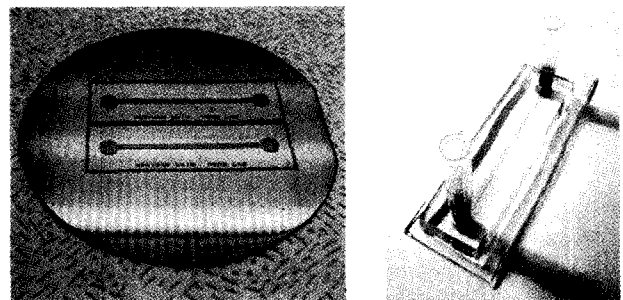


Figure 6. (a) Mold of LOC (Lab-on-a-chip) and (b) photograph of LOC.

PDMS LOC를 이용한 LAL 시험

LOC를 이용한 LAL 실험은 0.05, 0.5, 5 EU/ml의 CSE 농도에 대해서 비색법으로 시간에 따른 발색도의 변화를 측정하였다. Fig. 7에 따르면 endotoxin의 농도가 높아질수록 초기의 흡광도의 변화가 심하고 10분 이후에는 일정해지거나 오히려 감소됨을 알 수 있었다. Kinetic point 방법으로 405 nm에서의 흡광값이 0.01에 도달하는 시간을 측정하여 각 CSE 농도에 따른 표준곡선을 작성하였다(Fig. 8). 직선상관계수가

0.99 이상으로 매우 정확하며 측정에 소요되는 시간 역시 10-15분 이내로 단축됨을 알 수 있었다. 이 실험을 통해 기존의 LAL 시험법은 37°C에서 한 시간 동안 반응을 시킨 후 결과를 보는 방법에서 LOC를 이용하여 10분 이내로 측정시간을 단축할 수 있는 타당성을 제시하였다. 또한 측정에 사용되는 시료의 부피를 100 μ l에서 4.43 μ l로 감소시켰다.

LOC를 이용한 LAL 시험법은 기존의 실험법으로 수행한 결과와 비교해 볼 때 매우 높은 정확성을 보여주고 있다. 현재는 일자형의 LOC를 제작하였으나 LAL 시험법의 기본이 되는 시료와 LAL 시약의 주입구를 분리하는 방식과 동시에 다중 시료의 측정이 가능한 multi channel 형태의 LOC를 제작하여 경제성 있는 LAL 시험용 LOC를 개발하는 연구가 진행 중이다.

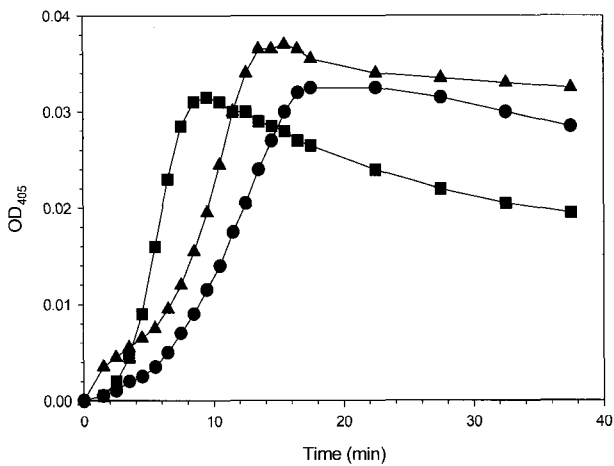


Figure 7. Effect of endotoxin concentration on optical density on LOC. 0.05(●), 0.5(▲), 5(■) EU/ml CSE.

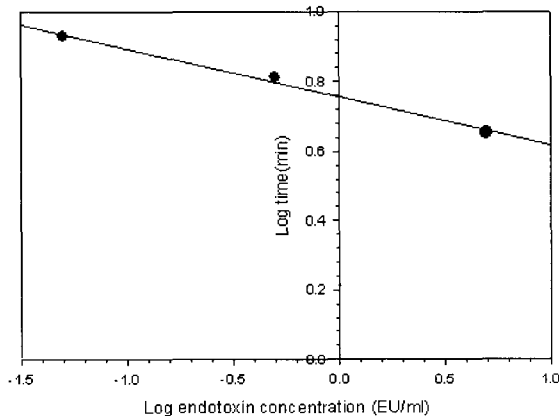


Figure 8. Kinetic point standard curve on LOC (on set OD₄₀₅ 0.01). Correlation coefficient is 0.99.

요 약

LAL 측정용 chip을 제작하기 위해서 우선 시료의 부피 감소에 대한 비탁법과 비색법을 비교하였다. 비색법은 낮은 부

피에서 높은 감도를 보여 주었으며 시료의 부피와 무관하게 같은 endotoxin의 농도에서는 같은 흡광도를 보인다는 결론을 얻었다. Endotoxin의 농도에 따른 표준곡선을 end point법과 kinetic point법을 비교한 결과 대한약전의 기준에 적합한 kinetic point법이 적합하였다. 이러한 기초 실험결과를 통해 PDMS LOC를 제작하여 LAL 시험을 수행하였다. LOC를 이용하여 더 짧은 시간과 더 작은 시료로 시험이 가능하도록 하였다. 특히 PDMS LOC는 복잡한 channel을 쉽게 만들 수 있을 뿐 아니라 mold를 이용하여 상용화를 위한 대량 생산이 가능하다. 따라서 PDMS를 이용한 LOC의 제작과 실험을 통해 기존의 수작업의 LAL 시험을 LOC를 이용한 다중시료 측정과 자동화의 가능성을 제시하였다.

감 사

본 연구는 한양대학교 마이크로바이오택센터의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kricka, L. J. (2001), Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century, *Clin. Chim. Acta* **307**, 219-223.
2. Yun, J., P. C. Wang, L. E. Locascio, and C. S. Lee (2001), Integrated plastic microfluidic devices with ESI-MS for drug screening and residue analysis, *Anal. Chem.* **73**, 2048-2053.
3. Fujii, T. (2002), PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications, *Microelec. Eng.*, **61-62**, 907-914.
4. Bernhard, H. W., L. B. Ron, and R. C. Catherine (2003), Lab-on-a-chip for drug development, *Adv. Drug Delivery Rev.* **55**, 349-377.
5. Pearson, F. C. (1985), Pyrogens: LAL testing, and depyrogenation, Endotoxins, Marcel Dekker, N. Y., pp23~56.
6. Takashi, M., T. Shigenori, N. Takanori, and I. Sadaaki (1981), A new (1→3)- β -D-glucan-mediated coagulation pathway found in Limulus amoebocyte lysate, *FEBS Lett.* **129**, 318-321.
7. James, F. C. (1975), Principle and applications of the Limulus test for pyrogen in parenteral drugs. *Bull. Parenteral Drug. Assoc.* **29**, 122-130.
8. Jeak, L. D. and H. Bow (2001), A new era in pyrogen testing, *TRENDS in Biotech.* **19**, 277-281.
9. Novitsky, T. J. and P. F. Roslansky, and G. R. Siber (1985), Turbidometric method of quantifying serum inhibition of Limulus amoebocyte lysate. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 211-216.
10. Gene, K. L., F. R. Priscilla, and J. N. Thomas (1989), Single-step, chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for endotoxin. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 947-951.
11. James, F. C. and M. P. Susan (1977), Detection of endotoxin in biological products by the Limulus Test, *Dev. Biol. Stand.*, **34**, 7-13.
12. Korean Pharmacopoeia (1997), 7th ed., pp969-973.
13. Karen, Z. M. and W. L. Cindy (1992), Viability in the LAL test: Comparison of three kinetic methods for the testing of pharmaceutical products, *J. Parenter. Sci. Technol.* **46**, 69-72.