

교차 전기영동법을 이용한 극소형 DNA 추출기

이소연* · 서경선* · 조영호†

(2004년 1월 5일 접수, 2004년 6월 14일 심사완료)

A DNA Microextractor Using Crossed Field Electrophoresis

Soyeon Yi, Kyoung-Sun Seo and Young-Ho Cho

Key Words : Bio-Separators(바이오 분리기), Bio-Extractors(바이오 추출기), Electrophoresis(전기영동), Crossed Electric Field(교차 전기장), Micropillars(극미세 기둥구조물), Lab-on-a-chip(미소분석기)

Abstract

This paper presents a microextractor for the separation of DNA molecules by their sizes. The DNA microextractor immobilizes the DNA molecules of specific size in the micropillar array by adjusting the period of the crossed electric field, thus providing a starting-point independent target DNA extraction method without separation process monitoring. The DNA microextractor has been fabricated by a three-mask micromachining process. The velocity of three different DNA molecules has been measured at the electric field of $E=5V/0.8cm$ in the fabricated DNA microextractor, resulting in the reorientation times of $4.80\pm 0.44sec$, $7.12\pm 0.75sec$, and $9.88\pm 0.30sec$ for λ DNA, micrococcus DNA, and T4 DNA, respectively. T4 DNA is trapped in the micropillar array when the crossed electric field of $5V/0.8cm$ is applied alternately at a 10 second time interval. The present DNA microextractor filters the DNA in a specific size range by adjusting the magnitude and/or the period of the crossed electric field applied in the micropillar array.

1. 서 론

최근 들어 질병의 진단 및 치료와 유전질환의 예방 등을 위해 대용량 유전자 정보 분석이 가능한 DNA 분석기에 관한 수요가 증대되고 있다. 이와 관련하여 극소량 DNA 시료를 사용하고 분석 시간의 감소와 효율성의 향상을 위한 MEMS 기술을 이용한 극소형 미소분석기(Lab-on-a-chip)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Lab-on-a-chip의 주요 구성 요소로는 시료 저장 및 배출구, 분리기, 증폭기(PCR), 그리고 판독기 등이 있으며, 본 논문은 이들 주요 구성요소들 중 분리기에 관한 것으로 MEMS 기술로 제작된 극미세 기둥구조물 영역 내에서 교차 전기영동법을 이용한 극소형 DNA 추출기를 제안하였다.

생화학적 물질의 분리에 널리 사용되는 기존의 방식 중 대표적인 것은 겔(gel)을 이용한 전기영동법이다. DNA 분석의 경우 겔을 이용한 단일 방향 전기영동법으로는 대략 15-20kbp⁽¹⁾ 이상의 대용량 DNA 분리가 어려워, 최근 들어 MEMS로 제작된 인공 겔과 전기영동법을 이용한 미소 분리기들이 개발되고 있다. 그러나 기존의 미소 분리기들⁽²⁻⁵⁾은 DNA 분자의 크기에 따른 속도차를 이용하여 일렬로 배열하는데 목적을 두고 있어 분리가 진행되는 동안 분리 과정의 지속적인 관측이 요구되고, 분해능의 향상을 위해서 전기영동이 시작되는 지점에서 DNA 분자들을 한 점 혹은 일직선 상에 정렬시키는 데 많은 시간과 노력이 필요하다. 이에 본 논문에서는 DNA 혼합물에서 원하는 크기의 DNA 분자를 분리·추출함에 있어서 특정 크기 이상의 DNA의 진행을 억제하고 나머지 시료는 극미세 기둥구조물 영역을 지나도록 하여, 시간에 따른 분리과정의 지속적 관측과 초기 시료의 정렬이 필요 없는 미소 DNA 추출기에 관한 연구를 수행하였다.

기존의 미소 분리기는 전기장 내에서 DNA 분자의 크기에 따른 진행 속도차를 이용한 것이었으

† 회원, 한국과학기술원 바이오시스템학과 및 기계공학과 디지털나노구조연구단
E-mail : nanosys@kaist.ac.kr
TEL : (042)869-8691 FAX : (042)869-8690

* 한국과학기술원 디지털나노구조연구단

나, 본 연구에서 제안한 DNA 추출기는 극미세 기둥구조물 내에서 전기장의 방향을 변화시켜 DNA 크기에 따라 재정렬 시간의 차이가 발생하게 한 것이 특징이다. 따라서 제안된 DNA 추출기는 외부에서 인가되는 교차 전기장의 크기 또는 주기를 변화시킴으로써 추출하고자 하는 DNA의 크기를 조절할 수 있을 뿐 아니라, 전기영동법을 이용한 기존의 DNA 분리기에서 요구되는 추출 분리 과정의 지속적인 관측이나 초기 시료의 정렬 문제를 해결할 수 있다.

2. 이론 및 설계

제안된 DNA 추출기는 Fig. 1과 같이 중심부의 극미세 기둥구조물 영역과 방사선 형태로 배열된 세쌍의 미소 유로, 전극창, 시료 주입구, 그리고 나노 엔트로피 방벽⁽⁶⁾이 부착된 시료 추출구들로 이루어져 있다.

극미세 기둥구조물 영역은 43,300개의 극미세 기둥구조물(Table 1)들이 평면상에 정삼각형 구도로 배치되어 있다. 기둥구조물 양 끝 전극으로부터 일정하게 인가되는 전기장에 따른 기둥구조물 내에서의 전기장 분포는 Fig. 2와 같이 기둥구조물의 배치 구도에 따라 달라진다. Fig. 2의 (b)에서와 같이, 극미세 기둥구조물을 정삼각형 구도로 배치하였을 때, DNA가 이동할 경로를 따라 일정한 전기장값을 가지는 통로가 형성되는 것을 알 수 있다. 따라서 교차 전기장의 각도를 고려한 미소 유로 또한 60° 주기로 배치되었고, 전체 극미세 기둥구조물 영역은 미소 유로와의 연계를 고려하여 정육각형 형태를 갖도록 설계하였다. 재정렬 시간 최소화를 위하여 인가되는 전기장의 교차각도를 Fig. 1과 같이 120°⁽⁷⁾로 하였다.

극미세 기둥 구조물 영역 안에서 전기장의 방향이 바뀔 때 따라 DNA 분자는 진행 방향을 전기장과 일치 되도록 바꾸는데, 이 때 진행 방향을 바꾸는데 소요되는 시간을 재정렬 시간 (Reorientation time)이라 칭하며, 그 시간의 크기는 DNA 분자의 크기와 비례한다. 이러한 DNA 분자의 크기에 따른 재정렬 시간의 차이를 이용하면 Fig. 3에서와 같이 교차 전기장 내에서 크기가 서로 다른 DNA 분자의 재정렬에 소요되는 시간차를 유발하여 DNA를 크기에 따라 분리 및 추출할 수 있다. DNA 분자가 완전히 펼쳐졌다고 가정할 때,⁽⁸⁾ 재정렬 시간, t_{re} ,은 다음과 같다.

$$t_{re} = c_1 \cdot N(E_0 / E) \cdot \tau_0 \tag{1}$$

여기서 실험적으로 결정되는 상수 c_1 은 전기장 방향으로 DNA가 완전히 펼쳐져 재정렬하는데 필요한 시간에 관한 영향인자를 의미하며, τ_0 는 Kuhn

segment⁽⁴⁾에 연관된 Brown 시간; E_0 는 Kuhn segment에서 Brown 힘이 지배적으로 작용하도록 하기 위한 전기장의 크기를 각각 나타낸다.

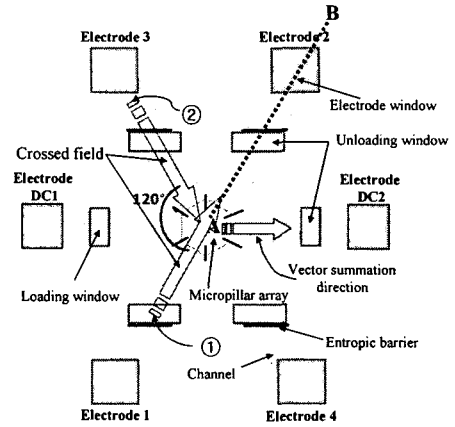


Fig. 1 Top view of the DNA microextractor

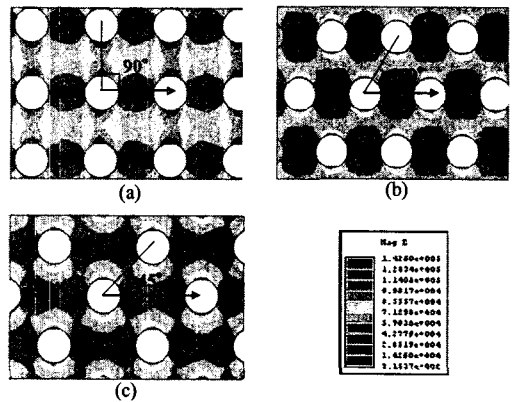


Fig. 2 Maxwell simulation of the electric field in the micropillar arrays, where a uniform electric field is applied to the silicon dioxide pillars distributed with the angles, θ , of (a) 90°, (b) 60° and (c) 45°

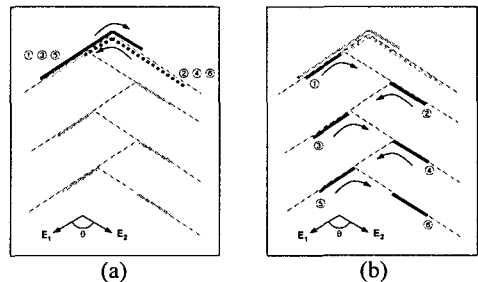


Fig. 3 Reorientation of DNA molecules in the micropillar array, when the periodically switched electrical field is applied at the angle of at 120°: (a) DNA molecules larger than a critical size; (b) DNA molecules smaller than a critical size

일반적인 생화학적 완충액에서 Kuhn segment 가 300bp 라고 가정할 때 τ_0 와 E_0 는 각각 $1 \times 10^{-3} \text{sec}$, $50 \text{V/cm}^{(4)}$ 이다.

또한 교차전기장, E ,가 일정한 각도 θ 와 주기 T 로 인가될 때, 미소기둥구조물내에 머물게 되는 DNA 분자의 크기에 관한 임계치 N_c 가 정의되며, 임계치보다 큰 DNA 분자의 경우에는 교차전기장 인가시 미소기둥구조물 내에서 이동없이 제자리에서 방향만 바꾸며 진동을 하게 된다. 임계치는 식 (1)에서 재정렬 시간과 교차전기장의 주기가 같을 때 다음과 같이 표현된다.

$$N_c = (T/\tau_0)(E/E_0)/c, \quad (2)$$

위 식 (2)에서 임계치 N_c 는 전기장의 크기와 주기에 비례하므로, 교차전기장은 분리 및 추출을 원하는 DNA 분자의 크기에 따라 결정되는 실험적인 변수이다. 임계치보다 작은 크기의 DNA 분자는 교차전기장의 두방향에 대한 벡터합 방향으로 이동을 하게 되는데, 이때의 이동속도를 구해보면 다음과 같다.

$$\begin{aligned} v &= v_0(1 - t_{re}/T) \cdot \cos(\theta/2) \\ &= v_0(1 - N/N_c) \cdot \cos(\theta/2) \end{aligned} \quad (3)$$

따라서 일정한 크기와 주기를 가지는 교차전기장을 인가했을 때, 임계치 보다 큰 크기의 DNA 분자는 미소 기둥구조물 내에서 진행하지 못하고 제자리에서 진동하며, 임계치 보다 작은 DNA 분자는 특정 속도를 갖고 진행을 하게 되므로, 그림 4 와 같이 임계치 이상의 DNA 분자만 미소기둥구조물 내에 남아있게 하고, 그 외의 DNA 분자는 배출구를 통해 추출할 수 있다. 또한 배출구 뒤쪽에 100nm 의 틈새를 나노 엔트로픽 방법을 설치하였는데, 이는 추출되어야 할 DNA 분자가 배출구를 지나 전극 주입구까지 유입되는 것을 방지하기 위함이다.

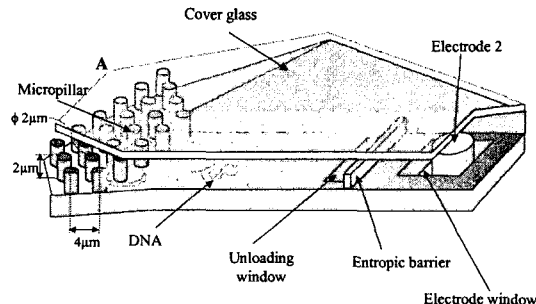


Fig. 4 Structure of the DNA microextractor between the point A and electrode 2 in Fig. 1

3. 제작 공정

설계된 DNA 추출기는 Fig. 5와 같이 세장의 마스크를 이용한 미소가공공정에 의해 제작되었다. 먼저 Fig. 5의 (a)와 같은 실리콘 기판 양면에 (b) 과정의 실리콘 습식 산화공정을 통하여 520nm 두께의 실리콘 산화막을 형성하고, (c)와 같이 첫번째 마스크를 이용하여 엔트로픽 방법의 위치를 정의한다. 이후 추가적인 산화공정을 수행하여 (c) 과정에서 산화막이 식각 되었던 부분에는 520nm, 산화막이 남아있던 부분에는 820nm 두께의 실리콘 산화막을 각각 형성한다. Fig. 5(e)에서 전체 실리콘 기판의 산화막을 제거하면 엔트로픽 방법이 정의된 위치에 약 100nm 의 단차가 발생하게 되며, 이후 (f)와 (g)에 도시한 바와 같이 실리콘 RIE (Reactive Ion Etching) 공정으로 미소기둥구조물과 미소유로를 동시에 형성하고, (h)와 (i)에서 실리콘 질화막을 마스크로 사용한 실리콘 기판의 KOH 식각 공정을 통해 시료의 주입, 배출과 전극의 주입을 위한 창을 형성하였다. 이후 실리콘 질화막을 제거하고, 친수성 미소유로의 형성을 위해 실리콘기판 표면에 300nm 두께의 산화막을 형성하였다.

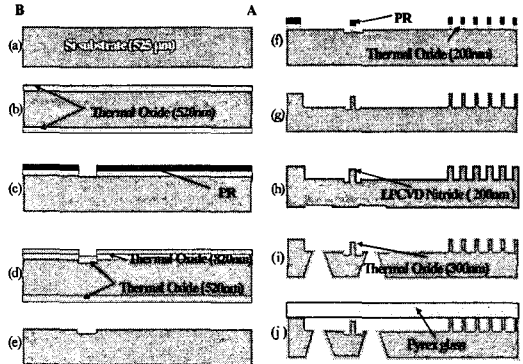


Fig. 5 Fabrication along the dotted line of A-B in Fig.1

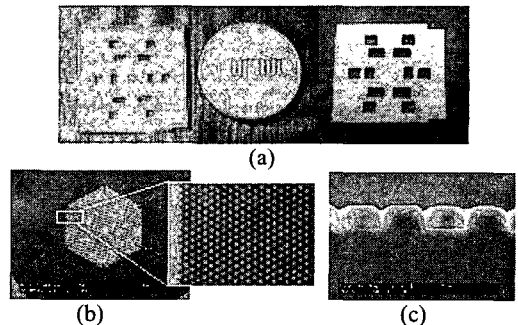


Fig. 6 Fabricated DNA microextractor: (a) Front-side and back-side views; (b) Overall and enlarged views of the micropillar array; (c) Cross-sectional view of the micropillar array

Table 1 Measured dimension of the micropillar array

	Micropillar height	Micropillar diameter	Micropillar spacing	Channel height
Dimension [μm]	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.03 ± 0.04

Table 2 Sample DNA molecules

Sample DNA (Supplier)	λ DNA (TAKARA Bio Inc.)	Micrococcus DNA (Sigma-Aldrich Co.)	T4 DNA (Fluka & Riedel Co.)
Size [kbp]	48.5	115	168.9
Radius of gyration [μm]	0.863	1.45	1.82

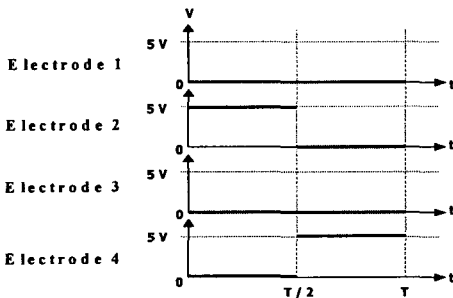


Fig. 7 Electric potential applied to each electrode in Fig. 1 for the crossed electric field

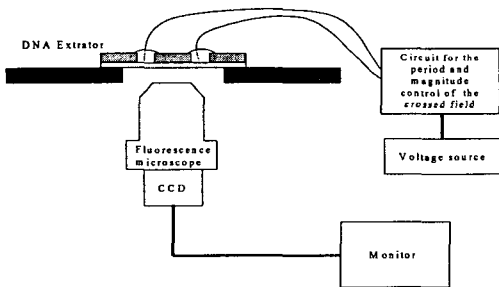


Fig. 8 Experimental apparatus

Fig. 5(j)에서 미소 유로의 덮개와 관측창 역할을 하게 될 파이렉스 유리를 양극접합 공정을 통하여 접합하였으며, 최종적으로 제작된 DNA 미소추출기는 Fig. 6 과 같다.

4. 성능시험 및 측정결과

제작된 DNA 추출기의 성능을 시험하기 위해 Table 2 에 설명된 바와 같은 3 종의 DNA 를 이용하였다. Fig. 1 의 시료 주입구 (loading window)로 주입된 DNA 분자는 전극 DC1 과 DC2 로 인가되는 전기장에 의해 미소 유로를

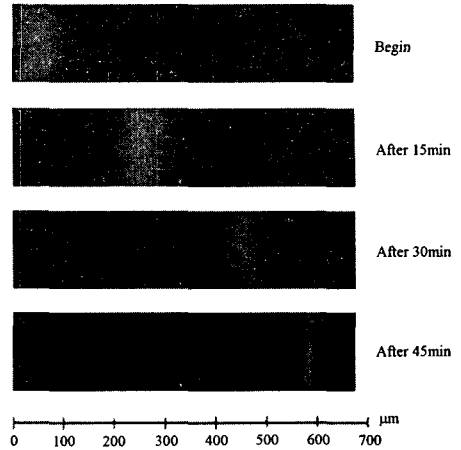


Fig. 9 Fluorescence microscope images of the T4 DNA migration captured at every 15 minutes: the voltage of 5V is applied between the electrodes at 0.8cm distance and is switched at the period of 12 sec

통하여 미소 기둥구조물 영역에 도달한다. 이후 DC1 과 DC2 에 의한 전기장은 제거되고, 전극 1,2 와 전극 3,4 에 의해 Fig. 7 과 같은 각 반주기씩 교차되는 교차전기장이 인가된다.

Fig. 8 과 같은 장치를 이용하여 형광현미경과 CCD 영상을 통해 각 DNA 별 진행 속도를 관측하고, 일정 시간 간격으로 촬영한 사진 (Fig. 9)을 분석하여 이동거리와 속도를 측정한다. Fig. 9 의 실험에서는 형광 염료 YOYO-1 을 사용하였으며, 교차 전기장의 크기는 5V/0.8cm, 주기는 12 초이었다.

Table 2 의 DNA 분자의 재정렬 시간은 식 (3)을 통해 계산할 수 있으며, 이렇게 얻어진 DNA 분자의 크기에 따른 재정렬 시간을 Table 3 에 정리하였다. 실험을 통하여 T4 DNA 의 경우 주기가 10 초, 5V/0.8cm 의 교차 전기장을 인가했을 때, 관측하는 30 분 동안 거의 진행하지 않고 제자리에 정지되어 있음을 확인 할 수 있었으며, 이때 T4 DNA 보다 작은 DNA 분자의 경우 극미세 기둥구조물 영역 밖으로 이동하여 작은 DNA 분자들과 섞여있는 시료 내에서 T4 DNA 만을 분리 추출하였다. 기존의 방법으로는 수십 kb 급 DNA 분리에 수 ~수십시간의 시간이 소요됨을 고려할 때, 본 추출기에서는 수백 kb 급 T4 DNA 를 30 분에 분리해 낼 수 있었기에, 본 추출기의 분리 추출 성능의 우수성을 확인할 수 있었다.

또한 제안된 미소 DNA 추출기는 유전자 분석을 위한 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) 유전자 도서관의 형성에 기여할 것으로 예상되며,⁽⁹⁾ 수백 kbp 급 대용량 DNA 활용 분야에 쉽게 접근 할 수 있는 도구로 사용될 수 있다.

Table 3 Measured migration velocity* and reorientation time of the sample DNA molecules listed in Table 2

DNA (Size)	v_0^{**} [$\mu\text{m/s}$]	Pulse period, T [sec]	Measured velocity, v [$\mu\text{m/s}$]	Reorientation time, t_{re} [sec]	c_1^{***}
λ DNA (48.5 kbp)	2.56 \pm 0.05	12	0.76 \pm 0.05	4.92 \pm 0.48	3.80 \pm 0.37
		10	0.68 \pm 0.05	4.68 \pm 0.40	3.61 \pm 0.31
Micrococcus DNA (115 kbp)	2.24 \pm 0.05	20	0.73 \pm 0.05	6.96 \pm 0.90	2.26 \pm 0.29
		12	0.44 \pm 0.05	7.28 \pm 0.55	2.37 \pm 0.18
		10	0.35 \pm 0.05	6.88 \pm 0.45	2.24 \pm 0.15
T4 DNA (168.9 kbp)	1.65 \pm 0.02	20	0.42 \pm 0.02	9.80 \pm 0.30	2.17 \pm 0.07
		12	0.14 \pm 0.02	9.96 \pm 0.29	2.21 \pm 0.06
		10	0.025 \pm 0.02	9.36 \pm 0.24	2.07 \pm 0.05

* Electric field of 5V is applied between two electrodes at 0.8cm distance

** v_0 is the measured migration velocity of DNA molecules for the electric field applied in constant direction.

*** the parameter for misaligned DNA molecules, c_1 , is extracted from the relation of $t_{re} = c_1 \cdot N(E_0/E) \cdot \tau_0$, where N is the number of Kuhn segment; E , the applied electric field; E_0 , the field required to dominate Brownian forces on the scale of a Kuhn segment; τ_0 , the Brown time associated with a Kuhn segment

5. 결론

본 논문은 DNA 미소분석기의 핵심 요소인 DNA 추출기의 개발에 관한 것이다. 본 DNA 미소 추출기는 특정크기의 DNA 분자의 분리 추출을 위해 기존의 다공성 매체인 겔 대신 높이, 직경 및 간격이 모두 2 μm 인 원형 미소기둥을 60° 각도로 배열한 미소기둥구조물을 사용하였다. 또한 미소기둥구조물에 120° 각도의 교차 전기장을 인가하여 DNA 크기에 따른 재정렬 시간차를 유발하였으며 이를 이용하여 특정크기의 DNA 빠른 속도로 분리 추출하였다.

제작된 DNA 미소분리기에 5V/0.8cm 크기의 교차 전기장을 인가한 경우 크기가 서로 다른 3종의 DNA 시료, λ DNA(48.5kbp), micrococcus DNA(115kbp), T4 DNA(169.8kbp)의 재정렬시간은 4.80 \pm 0.44sec, 7.12 \pm 0.75sec, 9.88 \pm 0.30sec 로 측정하였으며, 전기장 크기 5V/0.8cm, 교차 주기 10 초의 교차전기영동을 실시하여 상기 3종의 DNA 중 T4 DNA 만 진행이 억제되어 일정 시간 후에도 극미세 기둥구조물 내부에 잔류함을 실험적으로 확인하였다. 따라서 극미세 영역 내에서 교차 전기장의 크기와 주기를 변화시킴으로써 추출하고자 하는 DNA 분자의 크기를 조절 할 수 있으며, 이 때 결정된 값보다 작은 DNA 분자는 미소기둥구조물 영역을 빠져나가

고 원하는 크기의 DNA 분자를 선택적으로 추출할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.

제안된 극미세 DNA 추출기는 DNA 분석의 전처리 과정에서 특정 크기 이상 또는 이하의 DNA를 거르는 여과기로도 응용할 수 있으며, DNA 혼합물 내에서 특정 크기의 DNA를 고속 추출할 수 있어 DNA 미소분석기와 초고속 분석공정의 자동화 및 소형화에 기여할 것으로 예상된다.

후기

본 연구는 과학기술부의 창의적연구진흥사업의 일환인 "생체모사기법을 응용한 디지털나노구동기판의 구현에 관한 연구" 과제에 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- (1) McDonell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W., 1997, "Analysis of Restriction Fragments of T7 DNA and Determination of Molecular Weights by Electrophoresis in Neutral and Alkaline Gels," *J. Mol. Biol.*, Vol. 110, pp. 119~146.
- (2) Ertas, D., 1998, "Lateral Separation of Macromolecules and Polyelectrolytes in Microlithographic Arrays," *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 80, pp. 1548~1551.
- (3) Volkmuth, W.D. and Austin, R.H., 1992, "DNA Electrophoresis in Microlithographic Arrays," *Nature*, Vol. 358, pp. 600~602.
- (4) Duke, T.A.J., Austin, R.H., Cox, E.C. and Chan, S.S., 1996, "Pulsed-field Electrophoresis in Microlithographic Arrays," *Electrophoresis*, Vol. 17, pp. 1075~1079.
- (5) Bakajin, Duke, T.A.J., Tegenfeldt, J., Chou, C., Chan, S.S., Austin R.H. and Cox E.C., 2000, "Separation of 100-Kilobase DNA Molecules in 10 Seconds," *Anal. Chem.*, Vol. 73, pp. 6053~6056.
- (6) Han, J. and Craighead, H.G., 2000, "Separation of Long DNA Molecules in a Microfabricated Entropic Trap Array," *Science*, Vol. 288, pp. 1026~1029.
- (7) Akerman, B. and Jonsson, M., 1990, "Reorientational Dynamics and Mobility of DNA during Pulsed-Field Agarose Gel Electrophoresis," *J. Phys. Chem.*, Vol. 94, pp. 3828~3838.
- (8) Viovy, J.L., 1989, "Reptation-breathing Theory of Pulsed Electrophoresis : Dynamic Regimes, Antiresonance and Symmetry Breakdown Effects," *Electrophoresis*, Vol. 10, pp. 429~441.
- (9) Chou, H.P., Spence, C., Scherer, A. and Quake, S., 1999, "A Microfabricated Device for Sizing and Sorting DNA Molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 96, pp. 11~13.