

바이오 센서 및 랩온어칩

박유근(삼성종합기술원)

Abstract

Smart sensors and biochip technologies have received a great deal of attention in recent years not only because of the enormous potential markets in the healthcare expenditures but more importantly because of its great impact on the quality of human life in the future. Collaborative research among BT (Bio Technologies), IT (Information Technologies) and NT (Nano Technologies) will bring us a new paradigm of the healthcare services. Examples include disease prediction based on the genetic tests, personal medicines, point-of-care analysis, rapid and sensitive infectious disease diagnostics, environmental monitoring for chemical or biological warfares, intelligent drug delivery systems etc. In this report, recent accomplishment in the research area on biosensors, DNA chips, Protein Chips and Lab-on-a-chips are reviewed.

I. 서론

인간을 포함한 생명체들은 스스로의 삶을 영

위하기 위해 오감을 통해 독성이나, 온도, 압력 등 외부에서 오는 자극을 감지할 수 있다. 이렇게 감지된 자극을 미리 입력된 경험과 본능에 의하여 자극자료와 비교 처리함으로써 맛이나 향의 변화, 사물의 형상들을 판단할 수 있게 된다. 이러한 기능을 생명체에서는 감각기관이라고 하고, 기계화하거나, 소자화한 경우 이를 센서라 부른다.

최근 Human Genome Project의 완성 등으로 인하여 유전자에 관한 관심이 증대되어 있으며, 특히 DNA chip을 이용한 생명 공학의 급속한 발전은 인간의 의학 및 생활 전반에 대단한 혁명을 가져올 것으로 예견되고 있다. DNA chip을 사용하면 방대한 양의 유전 정보를 빠른 시간 내에 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 폭넓은 응용분야가 예상된다. 또한 미생물이나 환경 오염의 감지기로 이용, 해독 물질에 대한 유전자를 찾아내어 유전자 재조합 기술을 적용함으로써 해독물질을 대량 생산하거나 의약품 농작물, 저지방함유 육류의 생산에도 응용될 수 있

는 등 거의 대부분의 생물 관련 산업에 혁명적인 발전을 가져올 수 있다.

바이오센서는 광의적으로는 생체물질을 이용하거나, 생체물질의 특성을 모방하거나, 생체물질의 성질 및 반응을 측정할 때 쓰이는 센서를 포함하나, 현재는 생체물질을 이용하여 분석하고자 하는 화학물질이나, 생물을 선택적으로 감지할 수 있는 측정 장치로써 정의된다.

바이오센서가 주로 화학 물질 또는 바이오 물질을 검출을 위한 단일 공정을 가지고 있는 데 반해, 최근에는 MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 기술을 기반으로 제작한 Micro TAS (Total Analysis System) 또는 Lab-on-a-chip을 이용하여 분석에 필요한 각종 시료의 첨가, 희석, 혼합, 반응, 분리, 검출 등 모든 단계를 하나의 칩 상에서 수행할 수 있는 total solution을 제공하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

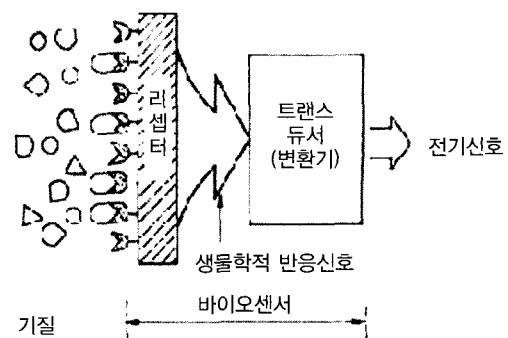
MEMS 기술은 반도체 제조에 이용되는 lithography 등의 미세 가공 기술을 이용하여 전기와 기계부품을 초소형으로 일체화하여 만드는 기술로써, 여러 가지 복잡한 단계를 거치지 않고 시료 주입만으로 최종 결과를 얻어낼 수 있는 시스템을 개발할 수 있기 때문에 사용의 간편성뿐만 아니라, 검사자의 실험상 오류를 최대한 제거하여 얻어진 결과에 대해 신뢰성을 부여할 수 있어서, 대중화에 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

본 고에서는 최근 각광받고 있는 바이오센서와 DNA chip, Protein Chip, Lab-on-a-chip의 연구 동향과 문제점, 향후 전망 등에 관하여 살펴보고자 한다.

II. 바이오센서

바이오센서는 1962년 미국의 클라크 (L.C. Clark) 박사가 혈액속의 포도당 농도를 관측하려는 생각에서 분자 식별능력을 갖는 효소와 산소전극을 포함하여 기질 (특정 측정물질)의 농도를 알 수 있다는 원리를 제안하면서부터 시작되었다. 이 제안된 바이오센서의 구조는 측정하고자 하는 물질을 선택적으로 감지할 수 있는 생체물질과 생체물질의 각종 반응을 측정/기록하기 쉬운 전기적 신호로 바꾸어주는 신호변환기 (Transducer)로 크게 구분되어 진다. [1]

바이오센서는 사용되어지는 생체감지물질과 신호변환기의 종류에 따라 많은 특성 차이를 가지고 있으며, 응용되어지는 분야에 따라 요구되는 특성을 포함해야 한다. 기본적으로 바이오센서를 제작할 때 각각의 용도에 따라 대표적인 센서 특징이 요구되어지는 데, 그것은 얼마나 적은 양을 측정할 수 있는가에 대한 민감도 (sensitivity) 특성, 얼마나 선택적으로 측정할 수 있는가에 대한 선택성 (specificity) 특성, 얼마나 신뢰할 수 있는 결과를 도출하는가에 대한 반복성 (repeatability or reproducibility) 특성과 더불어, 바이오센서의 중요한 변수 중에 하나인, 열



〈그림 1〉 바이오센서의 기본원리[1]

마나 오래 사용하고 보관할 수 있는가에 대한 안정성 (stability or shelf life) 특성 등을 들 수 있다 [2].

1. 생체 감지 물질에 따른 분류

현재까지 자주 쓰이는 생체감지 물질로는 특정 물질과 반응 및 결합할 수 있는 효소, 항체 (항원), 렉틴, hormone receptor 그리고 핵산 (DNA or RNA sequence) 등이 있다. 이러한 사용되어 지는 생체감지물질의 종류에 따라 바이오 센서는 효소바이오센서 (Enzyme biosensor), 항원-항체 바이오센서 (Affinity biosensor), 셀 바이오센서 (cell biosensor), DNA 바이오센서 (DNA biosensor) 등으로 구분되어 진다.

가장 많이 이용되어져왔고, 지금도 상당한 바이오센서가 사용하고 있는 효소의 경우, 사용의 편의성에 의해 오랫동안 사용되어져 왔으나, 항원 항체 반응을 이용하거나 DNA 등 핵산을 이용하는 경우에 비해 민감도와 선택성이 떨어지고, 고정화상태에서의 shelf life 감소로 인한 센서의 안정된 반복성을 구현하는 데 상당한 시간 및 노력이 필요하게 된다. 그럼에도 불구하고, 혈당을 측정하는 혈당센서를 포함하여 일회용 바이오센서 시장에 대부분을 차지하고 있으며, 항원-항체 반응을 이용하거나, DNA 및 RNA 측정을 위해서도 측정용 수단으로써 아직도 많은 연구가 진행되고 있다.

항원-항체를 이용할 경우는 효소를 이용하는 경우보다 선택성이 월등히 증가하게 되고, 효소를 이용할 경우에 발생하는 효소 종류의 한계로 인한 측정 물질 제약을 받지 않는다. 필요한 항체는 직접 토끼 나 쥐를 이용하여 polyclonal 항체를 제작할 수 있고, 추출 분리를 통해

monoclonal 항체를 얻을 수 있다.

DNA는 주로 DNA 와 같은 핵산을 증폭하거나 단백질과 같은 생체물질을 측정하기 위해 이용된다. DNA/RNA는 그 배열에 따라 높은 선택성을 가지게 되어, 많은 연구가 진행되고 있다. 또한 효소나 항체와 달리 DNA는 높은 안정성을 가지고 있기 때문에 최근 가장 많이 연구되어 지고 있다.

2. 신호변환기 원리에 따른 분류

생체감지물질의 반응결과, 즉, 특정 이온의 변화, 전기화학적 활성 물질의 농도 변화, 발열, 빛의 변화 (흡광, 형광 또는 발광), 흡착에 의한 질량변화 등을 처리하는 신호변환기 (Transducer)의 원리에 따라, 전기화학적 (electrochemical), 광학적 (optical), 열 (thermal), 그리고 압전 (piezoelectric) 바이오센서 등으로 크게 나눌 수 있다.

가장 널리 이용되고 있는 전기화학 방법은 전위 측정법과 전류 측정법으로 구별되고, 산화 환원 반응과 같은 특정한 전기화학적 특성을 가지는 측정대상물질에 적용될 수 있다. 그러나 특정 전기화학적 특성이 측정대상물질에 없는 경우에는 이용하기 곤란하고, 다른 바이오센서에 비하여 높은 측정 제한 범위를 가지고 있어 상대적으로 낮은 민감도를 요구할 때 사용되어 진다. 바이오센서의 경우는 전기화학식 방법을 사용할 때 나타나는 단점들을 극복할 수 있으나, 고가의 장비가 포함되어지고, 소형화를 하기 힘든 단점이 있다. 이에 반해 압전효과식 및 수정진동자식 센서는 낮은 측정 제한 범위를 가지나, 외부 환경에 또한 민감하게 반응하여 실제 상용화 센서로써 제작되기 위하여 적절한 잠신

호 제거 장치가 필요하게 된다.

3. 응용 분야에 따른 분류

바이오센서가 사용되어지는 응용분야별로 크게 혈당측정을 포함하여 젖산, 콜레스테롤, 요소 등 다양한 생체물질을 분석 진단하고, DNA 등을 측정하여 각종 질병진단 및 질병예측에 사용되는 의료용(Medical diagnostics), 공장 폐수(폐놀, Cyanide, 중금속) 및 농약 등을 측정하여 환경감시 측정 시스템을 위한 환경감시용(Environmental monitoring), 식품 잔류농약 및 GMO (Genetically modified organisms) 측정 및 식중독 균 검출을 위한 식품용 (Food screening), bio terror에 대비하기 위해 실시간 대기 및 수질에 있는 독성 (pathogenic) 박테리아 및 바이러스 측정을 위한 군사용 (Anti-bioterrorism), 제약, 화학, 석유화학 공정에서 특수 화학물질의 분석 및 생물발효공정에서 공정 자동화를 위한 산업용 (Process monitoring), 각종 미세 분자 측정 및 분자간 반응 특성 연구를 위한 실험연구용 등으로 구분되어 진다.

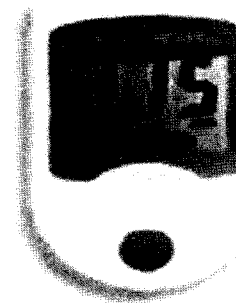
최근 바이오센서의 시장은 의료용 센서가 90%로 대부분을 차지하고 있으며, 전체 시장의 80%가 혈당센서가 차지하고 있다. 또한 전체 바이오센서의 시장은 향후 2005년 500억불이 넘어 서리라 추정된다. 이러한 바이오센서의 시장의 활성은 많은 부분을 차지하고 있는 혈당센서와 더불어 최근 응용성이 크게 부각되고 있는 식품 안전성 분석용 바이오센서분야, 그리고 바이오센서의 획기적인 전환점을 줄 것으로 기대되는 나노기술이 접목된 나노바이오센서 분야에 기대하고 있다.

위에서 언급했던바와 같이 바이오센서의 대부

분을 차지하고 있는 혈당측정용 바이오센서는 사회 경제적 발전에 의한 과식, 운동부족, 스트레스 증가 등으로 인하여 당뇨병 인구가 늘고 있는 추세와 더불어 수십년동안 연구가 활발히 진행되고 있으며 크게 채혈식과 비채혈식으로 구분할 수 있다. 채혈식 바이오센서는 채혈시 채혈량의 많고 적음에 상관없이 필연적으로 고통과 상처를 수반되는 결정적인 약점을 가지고 있다. 시중에 판매되고 있는 혈당기는 대부분 채혈식 혈당기로, 이러한 채혈식 기기는 전기 화학방식의 전극기술을 채택하고 있다. 핵심기술은 전극으로 하이드로겔(Hydrogel) 내에서 GOD와 Glucose가 반응하여 생성되는 Hydrogen peroxide에 의해 변화하는 current를 측정하는 기능이다. 하이드로겔은 Glucose와 Glucose oxidase(GOD)가 반응할 수 있도록 GOD를 효과적으로 고정시켜주는 역할을 한다.

혈당을 측정하는 방법으로 다른 착안점은 Cygnus사의 Glucowatch처럼 조직액의 당량을 측정하는 방법이다. 이는 완벽한 비채혈식 기기는 아니지만 피부 패치를 사용하는 혈당 측정기로, 혈액이 아닌 체액을 검체로 하여 고통 없이 혈당값을 산출할 수 있다.

Glucowatch는 시계모양의 기계 뒷부분에 붙



〈그림 2〉 채혈식 혈당계 예 [3]

은 patch에서 전기삼투압을 이용하여 빨아올린 조직액을 가지고 혈당농도를 측정한다. 이러한 기기는 20분마다 자동적으로 혈당값을 산출·저장할 수 있고, 이러한 혈당값을 통해 환자의 혈당값 변화추이를 파악할 수 있는 기기이다. 이는 환자의 편리성을 근간으로 두고 기기의 목적인 질병의 모니터링 뿐 아니라 질병 치료에 도움을 줄 수 있다. 구현 원리는 전기삼투압을 기본원리로 하는 것으로 피부에 미세한 전류를 가하여 피부 밖으로 글루코스를 추출하는 방식을 이용하는 것으로 일정한 미세 전류가 가해지면 양전하와 음전하를 가지는 이온들이 각각 양극과 음극이 적용되는 하이드로겔로 이동하게 되는데 이러한 이온들의 움직임과 함께 중성의 분자인 글루코스 역시 피부 밖으로 추출되어 하이드로겔 내로 모이게 된다. 수집된 글루코스는 하이드로겔 내에 고정되어 있는 글루코스 산화효소와 반응하여 과산화수소를 생성하게 되며, 센서내에 존재하는 전극에서는 이러한 효소반응에 의해 생기는 전기화학적 신호를 감지·측정하는 역할을 하게 되고 측정된 전기화학적 신호는 혈당값으로 변화될 수 있다. 美의 Cygnus社, Minimed社는 iontophoresis 방식 등을 이용 미량의 간질액(interstitial fluid)을 피부 표면으로부터 추출한 후 이를 효소 등과 반응시켜 혈당을 진단하는 연구를 진행해왔다. 두 회사 모두 현재 美 FDA 승인을 받은 상태이다. 그러나 이 승인 또한 의사의 처방전이 있는 경우에만 사용이 가능하다는 제한적인 승인을 받은 상태이다.

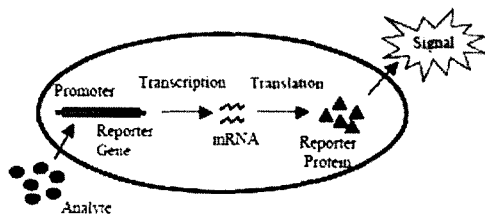
비채혈식 혈당센서기술은 체액 성분 중 혈당의 농도를 편리하고 손쉽게 고통 없이 측정할 수 있는 기술로, 근적외광을 이용한 분광 측정 방식은 상용화에 근접해가고 있는 기술로서 주

목을 끌고 있다. 분광학을 이용한 체액성분 진단에 있어서 가장 중요한 것은 정확도를 높이는 것이다 [4].

세계 인구의 약 3-5%로 추정되는 당뇨병 환자를 위한 혈중 글루코즈(혈당) 진단은 막대한 시장 수요로 인하여 많은 연구가 진행되고 있다. 비침습 혈당 진단은 미국의 Sensys Medical과 Lifetrac 등에서 활발히 연구가 진행되고 있다. 이중 가장 기술력이 앞서 있는 Sensys사는 전문가용 무혈혈당기를 2005년 말 FDA 승인을 목표로 하고 있으며, 저전력 소형광원(램프), fixed grating, InGaAs 어레이 센서 등으로 송신부와 수광부를 소형으로 구성하여 연구개발에 박차를 가하고 있다. 측정부위로 forearm에 빛을 조사하여 반사되는 광의 흡광도(absorbance)를 측정하여 성분농도를 예측하는 반사형 방식이다. 무채혈 혈당기 개발에 있어서 핵심기술은 센서 부도 물론 중요하지만, 무엇보다도 human interfacing 기술임을 간과해서는 안된다. 특히 생체 tissue를 인위적으로 조절하여 혈당농도를 측정하는 데에는 한계가 있으며, 가능한 생체 tissue를 일정하게 유지한 상태에서 혈당 정보를 추출해내기 위한 기술이 필요하다. 아직까지 근적외선 분광학을 이용한 무채혈 혈당기로 FDA 승인을 얻어 판매되는 있는 기기는 없으며, 또한 이러한 무채혈 혈당기의 상용화는 기술의 난이도를 생각하면 향후 몇년 후에나 가능할 것으로 사료된다.

식품안정성 바이오센서분야는 최근 급식산업의 활성화 및 단체 식품 가공 및 공업화된 식품 산업분야의 급속한 발전이 크게 부각되지 않고 있던, 집단 식중독 사고의 대형화에 의해 매년 급속도로 커지고 있는 분야이다. 이 바이오센서 분야는 무엇보다 신속하고 정확한 감지가 요구

되어지고 있다. 미국의 경우 매년 7천 5백만명이 식품 병원균으로부터 고통을 받고 있으며, 이 중 5000여명이 사망하고 있다. 주요 식품 유래 병원균은 살모넬라, 리스테리아, 캄필로박터, O157:H7 대장균이며, 국내에서는 2000년 총 7,300여건의 발생건수중 40%가 넘는 미생물에 의한 식중독 사고를 보여준다. 이러한 식중독균을 신속하게 측정할 수 있는 바이오센서로서는 미국 아칸소대학 (U. of Arkansas)의 과학자들이 제작한 센서로 닭의 시체로부터 두시간만에 살모넬라를 세균을 감지할 수 있고, Cornell대학교에서 개발한 strip 형 바이오센서는 역시 두시간 이내에, 음료수등에서 극저농도의 대장균을 측정할 수 있다 [5]. 조지아 공대 연구소(GTRI)도 독성 대장균이나 살모넬라를 포함한 여러 가지 독성 미생물의 존재 여부와 농도를 동시에 측정할 수 있는 바이오센서를 개발하였다. 극독성 미생물을 측정하기 위한 바이오센서는 미생물의 독성을 측정하여 미생물 전체의 양을 예측하는 항원-항체 방법으로부터 미생물내의 특정 DNA/RNA를 증폭하여 검출하는 DNA hybridization 방법까지 다양한 방법을 이용한다. 또한 MIT 대학교에서는 면역세포를 이용하여 수초내에 50 C.F.U. 정도의 독성 미생물을 측정할 수 있는 CANARY (Cell Analysis and Notification of Antigen Risks and Yields)



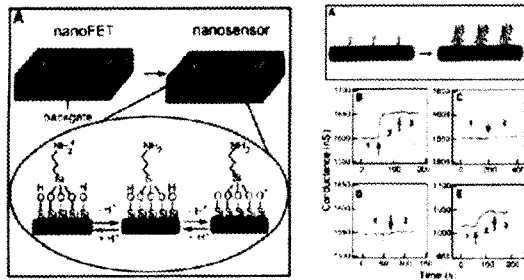
〈그림 3〉 발광을 이용한 cell biosensor의 원리[6]

biosensor를 개발하였다. 이 바이오센서는 면역세포의 일종인 B cell을 유전자 조작하여 특정 독성 미생물에 반응하도록 만든 후, 이에 의해 형광이 발생하도록 다시 재조합하여 사용하였다 [5,6].

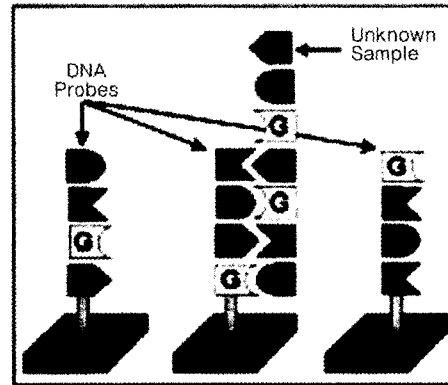
이러한 바이오센서기술의 발전은 실험실에서 24시간이상 걸리는 임상적 검사를 수분에서 수시간의 짧은 시간에 간편하게 측정하는 장점이 있음에도 불구하고, 상품화된 바이오센서의 대부분이 일회용 센서(disposable biosensor)에 그치며 측정물질 채취에도 어려움이 있는 실정이다. 따라서 이렇나 기존의 바이오센서의 한계를 극복하여 현장진단, 재택진단, 실시간 진단이 가능한 개선된 바이오센서의 개발이 요망되고 있다. 이러한 고기능 바이오센서의 개발을 위하여 최근 활발하게 진행되고 있는 분야가 나노기술을 응용한 바이오센서이다. 나노 바이오센서의 장점은 소형화를 기초로 하여 센서 신호의 고안정화, 빠른 응답시간, 고감도, 고선택성 등의 동작특성이 향상을 들수 있다. 이로 인해 단일세포의 측정이 가능하고, 연속적, 비침습적 실시간 측정 및 현장진단이 가능하게 될 것이다.

하버드대학의 화학과에서는 Nano FET을 이용한 바이오센서를 개발하여 2001년에 발표하였다. 이러한 나노바이오센서를 이용하여 10pM의 streptoavidin의 결합을 측정할 수 있어 기존의 단분자 분석 감도를 극복한 것으로 나타나고 있다. 이런 나노기술의 접목과 더불어 분석신호 해석 및 감도 향상기술의 발전은 나노사이즈의 거동분석 및 단생체분자 결합분석에 응용되어 많은 다른 분야의 기술적 발전에 큰 도움을 주고 있다.

이러한 다양한 바이오센서를 개발하는데는 나노기술, 반도체 공학기술, 전기화학기술, 광학



〈그림 4〉 나노FET을 이용한 pH 센서의 개념도와 실리콘와이어에 생체물질이 결합에 대한 실험 결과



〈그림 5〉 DNA chip의 기본 원리.

기술, 고분자 성형기술, 생물학, 미생물학, 등 다양한 분야의 전문지식과 기술이 필요하게 되며, 분자공정기술 및 박막 제조기술을 포함한 단백질공학, MEMS 기술등 이미 학계간 연계 기술로 인정받아온 기술까지 필요한 진정한 통합기술이 필요할 것으로 사료되어 이에 많은 분야의 연구와 기술발전에 관심과 참여가 필요할 것으로 사료된다.

III. DNA Chips

DNA chip은 실리콘이나 유리 등의 고체 표면에 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 짝이 맞으면 결합(Hybridization)하게 되므로, DNA chip 상의 어떤 위치에 염기 결합이 이루어지는 지를 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 아

니라, 유전자간의 상호 연관성까지 규명할 수 있게 되어, 앞으로 유전병 및 암의 진단, 돌연변이의 탐색, 병원균의 검출, 유전자 발현 분석, 신약 개발 등 폭 넓은 응용분야가 예상된다. 또한 미생물이나 환경오염의 감지기로 이용, 해독 물질에 대한 유전자를 찾아내어 유전자 재조합 기술을 적용함으로써 해독물질을 대량 생산하거나 의약품 농작물, 저 지방 함유 육류의 생산에도 응용될 수 있는 등 거의 대부분의 생물관련 산업에 혁명적인 발전을 가져올 수 있다.

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 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 안에 600,000 종류의 oligonucleotide가 심긴 칩을 만들 수 있으며, 유전자 발현 검색용 칩뿐만 아니라 암 관련 유전자인 p53와 BRCA1을 가진 칩, 에이즈의 원인인 HIV의 종류도 알 수 있는 칩 그리고 SNP (single nucleotide polymorphism) 측정용 chip등을 생산하고 있다.

삼성종합기술원 Biochip Project team에서는 인체 유전자 기능 분석, 암 및 질병 유전자 연구, 유전자 돌연변이 검색, 약제 내성 검색 진단, DNA염기 서열 분석, 병원성 미생물 동정등에 사용할 수 있는 DNA chip을 개발 하였으며 현재 MODY3에 대한 chip을 판매하고 있다.

GenSpector MODY3 Chip은 genotyping chip으로서 MODY3 gene 에서 발견된 100 여개의 mutation sites 가운데 2 개의 polymorphism sites를 포함한 70 개의 gene mutation site 들을 신속하게 검색할 수 있는 기능을 갖춘 DNA microarray 이다. 정확도가 90 ~ 95% 인 기존 sequencing방법을 보완할 수 있어 검색 결과에

대한 신뢰도를 높였다(99.7%).

IV. Protein Chips

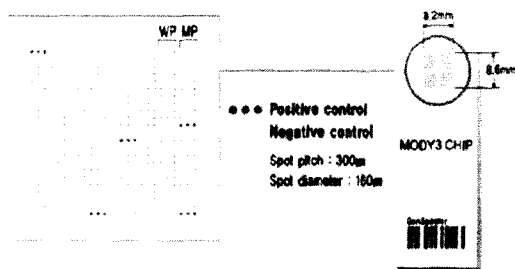
Protein Chip은 수십 - 수천개의 단백질을 고체 표면에 고정화하고 단백질간의 상호작용을 통하여 단백질의 발현 양상과 특성 분석 등의 기초 연구 뿐만 아니라 신약 개발 및 질병 진단 등에 이용할 수 있다.

Protein Chip은 DNA칩에 비하여 다양한 응용 분야를 가지고 있는데, 진단 분석(screening), 정량 분석(quantification), 단백질 상호작용 분석(kinetic measurement), 질량 분석(mass spectrometric analysis) 등 네 가지의 특성에 응용의 기초를 두고 있다.

Protein Chip에서 가장 핵심적인 기술로는 칩의 표면 처리 기술을 포함한 단백질의 안정적이고 고집적 고정화 기술(protein immobilization), 혈액내에서 샘플을 분리, 정제하고 단백질간의 결합반응을 유도하는 Sample Preparation/Assay 기술, 그리고 단백질간의 상호 결합을 효과적으로 분석할 수 있는 검출 기술(detection of protein interaction)로 분류할 수 있다.

1. 칩 표면 처리 및 단백질 고정화 기술

기존에 사용되던 생체분자의 고정화 방법은 생체분자의 인식부위(binding 혹은 interacting region)를 기능적으로 보존하면서 균일하고 고밀도로 고정하기가 어렵고, 비 특이적 단백질이나 ligand의 흡착이 심하여 분석의 민감도나 분해능을 크게 저하시키는 것이 문제이다. 따라서 단백질이나 ligand의 배향성(orientation)을 분자수준에서 조절하여 생체분자 인식부위가 보



〈그림 6〉 GenSpector MODY3 chip (삼성종합기술원)[7]

존되고 S/N 비가 크며, 고밀도로 고정화 시키는 기술에 집중적인 연구가 진행되고 있다.

단백질 분자가 칩 표면에 고정되는 방식은 DNA Chip과 거의 흡사하다. 다만 단백질의 경우는 고체 기판에 처리된 linker 분자의 여러 작용기들과 반응할 수 있는 amine(lysine의 side chain)이나 carboxylate(glutamic acid, aspartic acid의 side chain)가 그 자체표면에 존재하여 따로 linker를 연결하지 않아도 된다. 그러나 단백질 분자는 다양한 크기와 표면 전하를 가지고 있어서 고정화되는 물질의 특성에 따라서 고체 기판의 표면처리가 다양하게 요구되며, DNA와는 달리 생화학적 활성을 유지하는 일도 매우 중요한 점이다.

단백질이 고체 기질에 고정되는 방식은 공유 결합, 이온결합, charge-transfer complex 그리고 streptavidin과 biotin결합을 이용하는 방법 등을 들 수 있다. 최근에는 3차원의 gel-based pad-material에 단백질을 고정하는 기술이 많이 사용되는데, 이 방법은 gel-matrix를 이용하여 3차원의 gel에 probe를 고정함으로써 단위 면적당 보다 많은 양을 고정할 수 있어서 칩의 감도를 높일 수 있게 된다.

단백질 고정화의 예로 Zyomyx사에서는 실리콘 기판위에 수 마이크로미터 직경의 pole을 세운 micrarray를 제작하고, 각 폴의 표면을 linker로 처리한 단백질 칩을 개발하였다. 이 칩의 특징은 검출 감도를 떨어뜨리는 단백질의 비특이적인 물리/화학적 흡착을 최소화 하기 위한 물질로 polyethyleneglycol을 linker 물질로 사용하였다는 점이다.

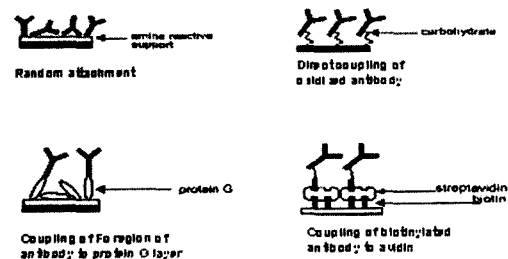
단백질을 특정 기질에 고정화 시키는데 있어서 문제가 되는 것은 고정화된 단백질이 단백질 본래의 특이성을 유지하도록 결합부위가 잘 드

러나도록 고정화 시키는 일이다. 단백질이 기질 표면에 고정화되면 수용액상에서 보다 분자의 자유도가 떨어져서 단백질 상호작용의 특이성이 줄어든다.

특히 물리적 흡착을 이용한 고정화 방법은 흡착된 단백질이 배향성을 상실하여 특정 분석 단백질의 특이적 반응성을 저해하여 다른 단백질과의 비특이적 반응을 유발하여 선택성을 저하시킨다. 따라서 단백질의 특이성을 유지할 수 있도록 항체를 배향성 있게 고정화 하는 기술의 개발이 이루어져야한다.

최근에 연구되고 있는 항체 고정화 방법은 무작위 고정화(random attachment)에 비해서 항체를 화학적으로 변형(chemical modification)하거나 혹은 항체의 활성부위 반대쪽(Fc region)과 잘 결합하는 Protein A 나 Protein G를 매개체로 이용하는 방법이 있으며, avidin-biotin 상호작용을 이용하는 방법 등이 있다.

Chemical modification 방법은 항체의 Fc region에 존재하는 carbohydrate를 periodate oxidation 방법에 의해서 aldehyde기로 변환시키고 amine기를 갖는 기질과 reductive amination coupling으로 고정화 하는 방법이며, 매개체를 이용하는 방법은 그림에서 보는 것과 같다.



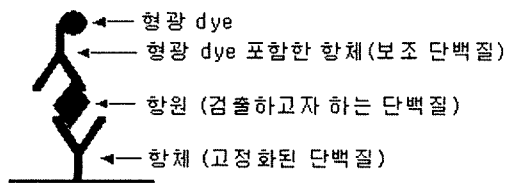
〈그림 7〉 항체 고정화 기술

2. Sample Prep./Assay 기술

혈액내에서 시료를 준비하는 기술은 DNA Chip에서보다는 쉬운 편으로 혈액내의 혈청을 분리하는 기술로 정의 할 수 있다. 일반적으로 혈청을 분리하는 기술은 원심분리법이 가장 많이 이용되고 있으며, filter를 이용하여 혈구를 제거해 내고 혈청을 분리하는 기술이 쓰이기도 한다. 이렇게 준비된 혈청을 고정화 된 단백질과 반응시켜서 검출하고자 하는 단백질과 specific한 반응이 일어나도록 한다. 가장 널리 사용하는 assay 방법은 아래 그림과 같은 항원-항체간의 sandwich 방법이다.

3. 단백질 검출

단백질간의 상호작용을 검출하는 방법은 DNA 칩에서와 마찬가지로 형광물질을 이용한 광학적인 방법이 가장 널리 이용되고 있다. 이 방법은 현재 사용하는 검출법 중에서 감도가 비교적 좋은 편이며, 한 실험조건에서 여러 형광 물질을 사용하여 다양한 대조군의 실험을 가능케 하는 장점이 있다. 그러나 이 방법은 고가의 tagging dye와 laser scanner를 이용하여야 하는 단점이 있으며 confocal laser scanner의 경우 해상도는 우수하나 한장의 칩을 읽는 시간이 5-10 분 정도 소용되는 문제점이 있고, CCD는 속도



〈그림 8〉 항원-항체간의 sandwich 결합 반응

는 빠르지만 다소 해상도가 떨어진다.

광학적 검출법의 또 다른 방식으로는 SPR(surface plasmon resonance)을 이용한 검출과 굴절률의 차이를 이용한 waveguide 방식 등이 있다.

또한 Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI-TOF) 등의 기술도 단백질칩의 검출에 널리 사용되고 있다. SELDI-TOF를 이용한 단백질 결합 분석은 칩에 결합한 단백질을 직접 분석할 수 있는 장점을 지니고 있다. 즉 질량 분석을 통해 얻은 단백질 스펙트럼을 데이터베이스와 비교해 칩에 결합한 미지의 단백질을 직접 분석할 수 있다는 것인데, 소수성 표면 단백질칩을 이용하면 Proteomics 기술을 대체할 수 있는 가능성을 가지고 있다.

V. Lab-on-a-chips

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.

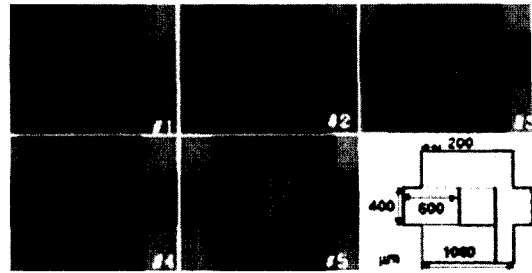
이에 반해, MEMS 기술을 이용하여 시료 희석, 혼합, 반응, 분리, 정량 등 모든 단계를 하나의 칩 위에서 모두 수행하도록 만든 것이 Lab-on-a-chip이다. 이렇게 MEMS 기술을 이용하여 microreactor를 제작하면, 각 microreactor의 온도나 농도 등의 반응 조건을 개별적으로 조절하면서 다양한 화학 반응을 하나의 chip 상에서 수행함으로써, 기존의 DNA microarray보다 훨씬 다양한 분야의 응용이 가능할 것이다.

Lab-on-a-chip의 핵심 기술 중 하나인

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 lab on a chip의 기본적인 핵심분야인 micro scale mixer와 genomics 응용분야의 PCR (Polymerase Chain Reaction)과 DNA Hybridization sensor의 예에 대하여 살펴보자.

1. Micro mixer

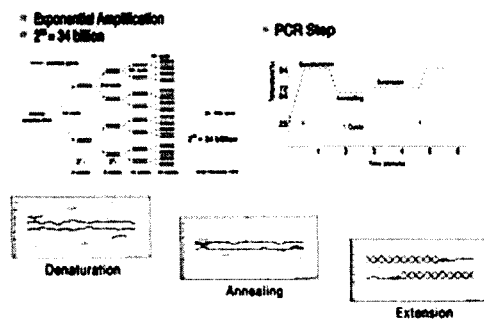
microscale에서의 유체의 흐름은 레이놀즈 수 (Reynolds number)가 작기 때문에 와류 (Turbulence)가 아닌 층류(Laminar flow) 영역에 속하여 두 개의 용액의 혼합은 오직 확산에 의해 이루어지게 된다. 그러므로, 수십 μm 의 크기를 가지는 채널내에서의 두개 이상의 용액의 혼합은 수백초에서 수분이 걸리게 된다. 특히 용액안에 큰 분자량을 가진 물질이 포함되게 되면 확산에 의한 분자들의 혼합은 거의 불가능해지게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위해 각종 micro-mixer들이 많이 개발되어 왔으며, 이는 크게 채널의 모양을 변형하여 유체를 혼합시키는 static mixer와 외부의 에너지에 의한 dynamic mixer로 구분할 수 있다. static mixer의 경우 혼돈이류 (chaotic advection)란 현상을 이용하여 채널을 복잡하게 꼬아서 사용하는 구조를 널리 이용한다. 그 예로 한국 KAIST에서는 3차원으로 구성된 수동 미소 유체 혼합기를 개발하였다. 이 혼합기를 이용하면, 두 유체를 0.5초내에 혼합할 수 있다.



〈그림 9〉 3차원 수동 유체 혼합기의 실험결과 ($Q = 2\text{mL/min}$)

2. MicroPCR

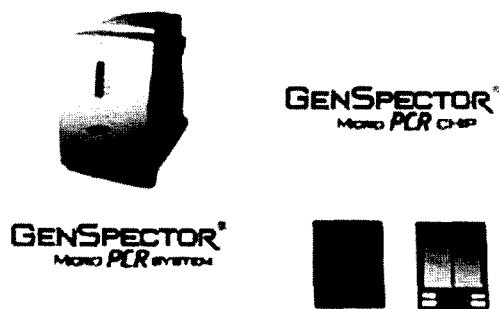
PCR은 생명공학 역사상 가장 혁명적인 기술의 하나로서, 그림 10에 개략적으로 나타낸 바와 같이, 증폭하고자 하는 DNA와 primer, 그리고 열에 안정한 중합효소(polymerase)를 사용하고, 샘플의 온도를 올렸다 내렸다 하는 과정을 반복함으로써 DNA의 원하는 부분의 수를 증폭하는 기술이다.



〈그림 10〉 PCR(Polymerase Chain Reaction)의 원리

PCR을 chip상에서 하면, nanoliter volume의 시료만으로도 증폭이 가능하므로, 값비싼 효소를 훨씬 적게 사용할 수 있어 시약 값을 절약할 수 있고, microchannel에서 열전도도가 좋다는 장점으로 인하여 단시간 내에 온도변화가 가능하므로, 반응 시간을 단축시킬 수 있다.

삼성종합기술원 Digital Bio Lab에서는 silicon/glass chip을 이용하여 1 μ L volume의 샘플을 사용하여 20분 이내에 PCR의 과정을 수행할 수 있는 GenSpector Micro PCR System을 개발하였다. 이는 20 $^{\circ}$ C/sec이상의 온도 상승 속도와 10 $^{\circ}$ C/sec이상의 온도 하강속도를 가지고 있으며, 적용 양의 샘플을 사용함으로써 전체 PCR시간을 20분 이내로 단축시켰으며 HBV 임상 실험에서 환자와 정상인을 97.8%이상으로 구분하는 놀라운 성능을 보였다. 또한 기존의 plastic tube를 이용한 PCR보다 적은 샘플을 사용하더라도 우수한 민감도와 특이도를 갖는 것으로 나타났다. GenSpector Micro PCR System은 일반적인 PCR은 물론 진단검사, 식품검사, 환경검사 등 높은 정확성과 신속한 결과를 요구하는 경우에 더 좋은 결과를 나타낼 수 있다.



(그림 11) GenSpector Micro PCR System (삼성종합기술원) [7]

3. Label-free DNA Sensors

기존의 DNA chip은 대부분 샘플 DNA를 측정하기 위해 형광색소가 붙어 있는 probe와 칩 위에서 반응시킨 후 confocal microscope나 CCD

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

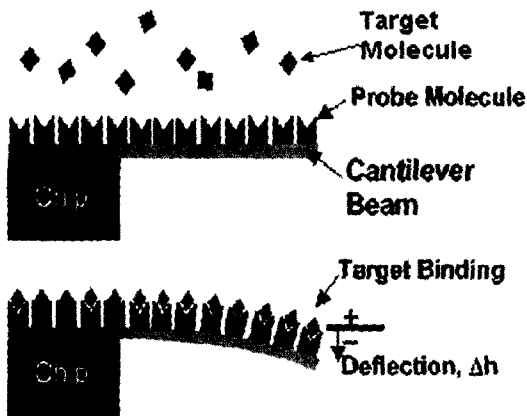
Chip의 검출 감도를 향상시키기 위해서는 가능한 probe의 surface density를 증가시키는 것이 중요하다. 이를 위하여 여러 가지 다양한 시도가 있는데, 3차원의 hydrogel pad를 이용하는 방법, dendrimer를 이용하여 probe와 형광물질의 밀도를 증가시키는 방법, DNA와 antibody를 함께 이용하여 형광물질의 양을 증가시키는 hybrid capture probe, 일정한 모양의 pore로 구성된 glass substrate를 사용하여 기공 표면에 probe를 고정시키는 방법 등의 많은 새로운 시도가 있다.

Clinical Micro Sensor를 비롯한 많은 연구 기관들이 산화/환원이 쉬운 금속 화합물을 이용하여 DNA hybridization을 전기화학적 방법으로 검출하는 방법에 관하여 연구하고 있다. DNA가 Hybridization 되었을 때, 산화/환원이 쉬운 금속을 포함한 다른 화합물이 같이 complex를 이루게 되고, 이를 전기화학적으로 검출하는 것이다. 이렇게 전기 신호를 내는 DNA sensor를 이용하면, 기존의 고가의 커다란 장치가 필요없게 되어 Lab-on-a-chip의 실현에 중요한 역할을 한다.

형광물질들 신호 물질을 포함하지 않고 직접적으로 DNA등 생물물질을 검출하기 위한 센서가 많이 고안되었는데 대표적인 예가 cantilever를 이용한 mechanical sensor이다. 스위스 IBM 연구소에서는 microfabricated된 cantilever를 이용하여 DNA oligomer probe와 샘플간의 분자간 결합력을 측정하는 방법으로 하나의 염기차이

까지 분석할 수 있었다.

또한, 한국 KIST에서도 cantilever를 이용하여 생물분자를 검출하는 active type의 cantilever sensor 시스템을 개발하였다. MEMS 기술을 이용하여 cantilever를 제작한 후, cantilver 극단에 항체나 DNA 등 probe를 고정화시킨 후 반응물질과 반응시켰을 때, frequency가 변화하는 것을 측정하는 것을 측정하였다. [8]

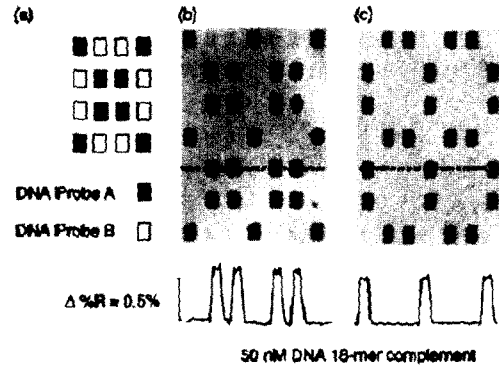


〈그림 12〉 cantilever를 이용한 biomolecule의 측정 원리도 (ORNL)

이러한 cantilever를 이용한 바이오센서는 미국의 ORNL (Oak Ridge National Lab)에서도 많은 연구가 이루어져 있다. 이 cantilever는 frequency를 측정하는 KIST와는 달리 cantilever의 휘어짐 정도를 기존의 AFM 장치와 같이 photodiode position sensor를 이용하여 측정하게 된다. 이런 기계적 측정 (mechanical detection) 시스템은 측정장치를 nanoscale로 제작할 수 있어 lab-on-a-chip 제작시 소형화가 가능한 장점이 있다.

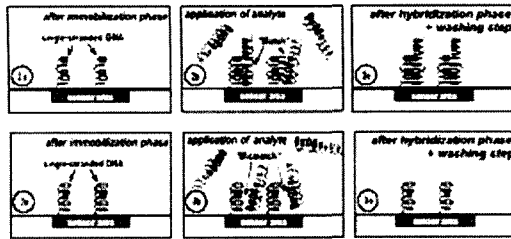
또한, label-free 측정방법 중 대표적인 방법으로는, SPR (Surface Plasmon Resonance)를 이용하는 방법이 있다. SPR을 이용하게 되면, 표면에 고정화되어 있는 단일구조 probe와 샘플과

hybridization이 일어난 이중구조 DNA를 구별할 수 있게 된다. 이러한 방법은 최근에 소형화되고 있는 SPR 장치에 의해 연구가 더욱 가속화되고 있다.



〈그림 13〉 SPR 원리를 이용한 Hybridization 검출 예. (a) Array Pattern 설명, single stranded DNA Probe A와 B의 위치가 표시 되어 있음. (b) Probe A와 perfect match 되는 target으로 hybridization 실험 한 경우, (C) Probe B와 perfect match되는 target으로 hybridization 한 경우 [9]

MIT의 Manalis교수는 단일 구조의 DNA와 이중구조의 DNA가 charge의 크기가 다르다는 점에 착안하여 금 전극표면에 전도성 고분자를 코팅한 후 그위에 probe DNA를 고정화 시키고, 샘플 DNA와 반응한 후 금전극 표면의 표면전위를 측정함으로써 고정화되어 있는 probe와 반응한 샘플 DNA를 20mV이상의 S/N ratio를 가지고 측정할 수 있었다. 이러한 단일 구조의 DNA와 이중구조의 DNA의 전기적인 성질 차이를 이용한 DNA sensor는 BioFET (bio-Field effect transistor)이라 불리는 DNA sensor를 탄생시켰다.



〈그림 14〉 CMOS의 gate 표면 위의 고정화된 probe와 사용 예

이 BioFET은 charge sensor의 일종으로 ISFET (Ion selective Field Effect Transistor) 과 비슷한 구조를 가진다. 원리는 MOSFET (Metal-Oxide-Insulator FET)의 gate part에 probe를 고정화시키고, 샘플과 반응시켜 gate 표면에서 반응하는 hybridization 반응을 charge의 크기로 측정하는 방법이다. 이방법은, 반도체 공정을 그대로 적용할 수 있어서, 고집적화가 현실적일뿐아니라, 직접적으로 전기적인 신호를 받아들이기 때문에 부가적인 측정 장치가 필요하지 않다는 장점이 있다.

그 외에도, Optical fiber를 이용한 microarray, Quartz Crystal Microbalance를 이용하여 결합 전후의 질량 차이를 측정하는 방법, 그리고 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) mass spectrometry를 이용하여 분석하는 방법 등이 개발되었다.

VI. 결론

이상에서 최근 활발한 연구가 진행되고 있는 Biosensors, DNA chips, Protein chips, Lab-on-a-chips 등의 연구 현황에 대하여 알아보았다. 이러한 분야의 연구가 실제로 바이오 산업 전반에 이용되기 위해서는 아직 그 요소기술의 개발과 시스템 차원의 integration에 관한 연구가 필요

하다.

이에 삼성 종합 기술원 Digital Bio Lab.에서는 차세대형 DNA Lab-on-a-chip 개발을 위하여 MEMS 기술을 이용하여 DNA 추출 및 증폭, 분석을 할 수 있는 chip과 microfabricated biosensor 개발에 관한 연구를 수행하고 있다.

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

참고문헌

- [1] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 16, pp. 121-131, 2001.
- [2] H.H. Weetall, "Chemical sensors and biosensors, what, where, when and how", *biosensors and bioelectronics*, Vol.14, pp. 237-242, 1999.
- [3] 김민곤, 보건산업기술동향, 2002.
- [4] P. D' Orazio, "Biosensors in clinical chemistry", *Chinica Chimica Acta*, Vol. 334, pp. 41-69, 2003.
- [5] A. J. Baeumner, R. N. Cohen, V. Miksic and J. Min "RNA Biosensor for The Rapid Detection of Viable Escherichia Coli in Drinking Water", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.18, pp.405-413, 2003.
- [6] T. H. Rider, M. S. Petrovick, F. E. Nargi, J. D. Harper, E. D. Schwoebel, R. H. Mathews, D. J. Blanchard, L. T. Bortolin, A. M. Young, J. Chen, M. A. Hollis, "B cell-based sensor for rapid identification

of pathogens, science”, Vol. 301, pp 213-215, 2003.
 [7] www.genspector.com
 [8] D.H.Kim, K. Kim, and J. Hong, “Implementation of a self-sensing MEMS cantilever for nanomanipulation”, The 4th Korean MEMS conference, 12-,13, 2002.
 [9] B. P. Nelson, T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman, and R. M. Corn, “Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays”, Anal. Chem., 73,1-7, 2001

저자소개



박 유 근

1980년 SUNY/Bufalo 기계공학과(학사)
 1982년 Stanford Univ. 기계공학과(석사)
 1985년 Stanford Univ. 기계공학과(석사)
 1985년-1994년 Grumman Corp. Res. Center 수석연구원
 1994년-1995년 SUNY/Bufalo 연구교수
 1995년-현재 삼성종합기술원 Digital Bio Lab 장
 주관심분야 BioMEMS, Lab-on-a-chip, Nanobiotechnology

용 어 매 설

블루투스 (Bluetooth)

무선 통신 기기 간에 근거리(short range)에서 저전력으로 무선 통신을 하기 위한 표준. 예를 들면 이동 컴퓨터(mobile computer), 휴대폰, 헤드셋, 개인 휴대 정보 단말기(PDA), PC 및 프린터 등의 기기 간에 정보 전송을 목적으로 하고 있다. 현재 세계적으로 2,400개 이상의 회사가 블루투스 SIG(Special Interest Group)를 형성, 장비간 상호운용을 보장하기 위해 협력하고 있다. 대표적인 회사로는 에릭슨사, IBM사, 인텔사, 루슨트사, 마이크로소프트사, 노키아사, 도시바사, 모토로라사, 삼성전자, LG전자 등이 참여하고 있다.

웹 패드 (webpad)

노트북과 PDA의 중간 크기의 휴대용 무선단말기. 이 기기는 액정화면에 터치스크린 방식으로 글자를 입력하여 사용하는 이동식 무선 단말기이며, 전자메일, 워드프로세서, 전자서적 등의 다양한 기능을 지원한다. 컴퓨터보다 저렴하면서도 증권거래, 인터넷방송, 게임 등의 기능을 지원하는 장점을 가지고 있으며, HA(Home Automation)분야에서 크게 부각될 것으로 예측된다.