

비드를 이용한 면역분석용 마이크로필터 칩의 제작

이승우* · 안유민† · 채영규**

(2004년 5월 4일 접수, 2004년 7월 21일 심사완료)

Microfilter Chip Fabrication for Bead-Based Immunoassay

Seung-Woo Lee, Yoomin Ahn and Young-Gyu Chai

Key Words : Biochip(바이오칩), Immunoassay(면역분석법), Replica Molding(복사몰딩), Microbead(마이크로 비드), Microfilter(마이크로 필터)

Abstract

Immunoassay is one of the important analytical methods for clinical diagnoses and biochemical studies, but needs a long time, troublesome procedures and expensive reagents. In this study, therefore, we propose the micro filter chip with microbeads for immunoassay, which has pillar structures. The advantage of the proposed micro filter chip is to use simple fabrication process and cheap materials. The mold was made by the photolithography technique with Si wafer and negative photoresist SU-8. The replica was made of PDMS, bonded on the pyrex glass. The micro filter chip consists of inlet channel, filter chamber and outlet channel. HBV (Hepatitis B virus) monoclonal antibody (Ag1) labeled with biotin were immobilized onto streptavidin coated beads of 30~50 μm size. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled HBV monoclonal antibody (Ag8) was used to detect HBsAg (Hepatitis B virus surface Antigen), and fluorescence intensity was monitored by epi-fluorescence microscope. In this study, the immune response of less than 30 min was obtained with with the use of 100 μl of sample.

1. 서 론

최근 생명공학에 관한 많은 연구가 이루어짐에 따라 멤스(MEMS) 기술과 분자생명학 기술이 접목된 바이오멤스(Bio-MEMS)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.^(1,2) 바이오칩은 주로 반도체 제작 공정을 응용한 바이오멤스 기술에 의해 제작되고 있다. 바이오칩은 소형화가 가능하여 적은 양의 시료만으로도 빠른 시간 안에 여러 가지의 진단과 검사를 간편하게 수행할 수 있다는 장점 때문에 차세대 분석시스템으로 각광을 받고 있다.

유리(Pyrex glass)는 반도체 제작 공정에서 일반

적으로 쓰이는 실리콘과 유사한 물성을 가지면서도 생화학 시료와 반응성이 적고 투명한 이점이 있어서 바이오칩 재료로 많이 사용되지만, 취성 재료인 까닭에 가공이 어렵고 재료 가격과 가공비가 비싸다는 단점이 있다. 이런 단점을 극복하기 위하여 다양한 폴리머 소재를 사용한 바이오칩이 제작되고 있다. PDMS (poly-dimethylsiloxane), PMMA (polymethylmethacrylate), PC (polycarbonate) 등의 폴리머 소재는 생화학적 안정성이 우수하며, 제작이 용이하고 상대적으로 비용이 저렴하여 대량생산에 적합할 뿐만 아니라, 투명하여 광학검출 방법을 사용하는 데도 문제가 없다. 이러한 폴리머 소재를 이용하여 바이오칩을 제작하는 방법에는 REM (replica molding), μTM (micro transfer molding), MIMIC (micro molding in capillaries), hot embossing 등의 방식이 있다.⁽³⁾

면역분석법 (immunoassay)은 항원(antigen)항체(antibody) 반응을 이용한 분석을 통칭한다. 항원항체반응이란, 항원과 이것에 대응하는 항체와의 사

* 한양대학교 대학원 정밀기계공학과

† 책임저자, 회원, 한양대학교 기계공학과, 마이크로바이오칩센터
E-mail : ahnym@hanyang.ac.kr
TEL : (031)400-5281 FAX : (031)406-5550

** 한양대학교 생화학및분자생물, 마이크로바이오칩센터

이에 일어나는 특이적인 반응을 일컫는 것으로써, 면역반응 및 감염진단에 사용되고 있다. 기존의 항원항체반응은 시험관 등을 이용하여 시행되었기에 적정량 이상의 시료를 필요로 하게 되며 일반적으로 짧지 않은 시간이 필요하다. 하지만, 바이오칩을 이용할 경우 매우 미량의 시료만으로 매우 짧은 시간에 반응결과를 얻을 수 있으므로 비용 및 시간 면에서 유리한 이점을 가지게 된다.

면역분석용 바이오 칩으로서, Hatch 등은 항원과 항체 시료 액체를 각각 T 자 형태의 마이크로 채널(channel) 내에 주입하고, 시료들이 채널 내를 흐르는 동안 두 시료 액체간 확산 현상을 이용하여 항원항체반응을 검출하였다.⁽⁴⁾ 그러나 액체가 흐르는 과정에서 반응을 검출하여야 하기에 검출 측정을 여러 번 시도하기가 불가능하다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하고자 Sato 등은 마이크로 채널 내에 댐형태의 필터를 만들고 항체가 고정된 마이크로 비드(bead)를 채널 내에 주입하여, 필터 앞에 다량의 비드가 대량 모이게 한 후, 항원과 항체를 순차적으로 채널에 주입함으로써, 채널 내 정지된 비드에서 다량의 항원항체반응을 발생시켜 검출을 용이하게 하는 방법을 제시하였다.⁽⁵⁾ 댐 방식의 필터는 마이크로 채널의 유동부 단면적과 필터부의 단면적 차이가 매우 커 유동효율이 좋지 못하므로 기둥 형태의 필터가 보다 효율적일 수 있다.^(6,7) Helen 등은 기둥(pillar) 필터의 간격을 수 μm 정도까지 구현하여 다양한 크기의 마이크로 비드의 사용을 가능케 했으나, 실리콘으로 바이오칩을 제작함으로써 많은 비용이 들고 복잡한 공정을 수행해야 하는 단점을 갖고 있다.⁽⁶⁾

본 논문에서는 가격이 저렴하며 생화학적으로 안정한 PDMS 로 기둥 구조물의 마이크로 필터를 제작공정이 단순하고 REM 제조법으로 만들고, 마이크로 비드를 사용하여, 기존의 단점을 보완한 면역분석용 바이오칩을 제작하고 특성을 평가하였다.

2. 마이크로 바이오칩의 설계

2.1 면역분석법

일반적으로 하나의 항원에 결합이 가능한 항체는 두 가지로 분류된다. 다중클론성(polyclonal) 항체의 경우에는 항원의 어느 부위에나 반응(결합)이 가능하지만, 단일클론성(monoclonal) 항체는 항원과 결합시 항원의 특정부위에만 반응(결합)할 수 있다. 이러한 단일클론성(monoclonal) 항체를 사용하여

면역분석을 수행하는 샌드위치법(sandwich method)과 마이크로 비드를 이용하여 실험을 수행하였다. 샌드위치법을 수행하기 위해서는 마이크로 필터에 의해 마이크로 비드 만이 필터링되고 항원 및 항체 등의 다른 물질들은 필터링이 되지 말아야 한다.

본 연구에서는 Fig. 1 과 같은 항원항체 반응법을 이용하였다. 먼저 마이크로 비드에 단일클론성 항체를 고정(immobilization)시키고, 고정된 항체에 항원을 결합(반응)시킨 뒤, 바이오칩 채널 내에 주입시켜 필터 앞 챔버 내에 다량 모아지게 한다. 그 후 형광물질로 표시(labeling)되어 있는 단일클론성 항체를 바이오칩 내에 주입시켜 필터 앞 비드에 결합되어 있는 항원과의 반응을 유도한다. 끝으로 세척액을 바이오칩 내에 주입시키면, 항원과 단일클론성 항체 사이에 반응(결합)이 안 일어나는 경우에는 형광물질이 항체와 함께 배출될 것이다. 따라서 필터 앞 챔버(chamber) 내에서 형광이 검출된다면 항원항체 반응(결합)이 형성된 것으로 알 수가 있다.

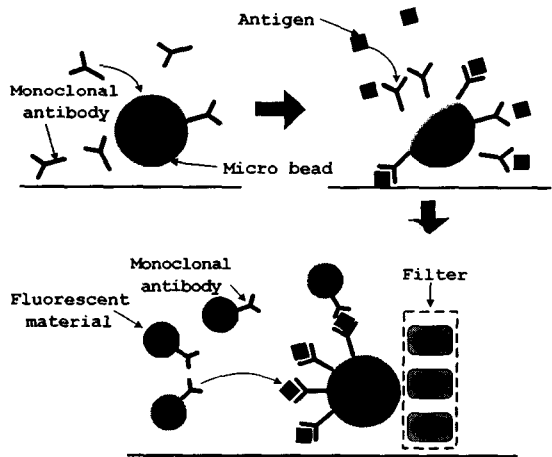


Fig. 1 Schematic illustration of sandwich method

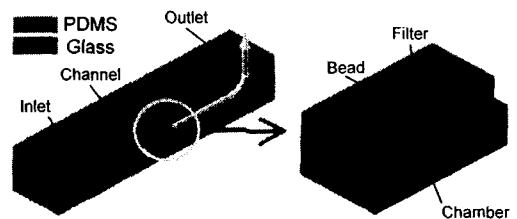


Fig. 2 Schematic of biochip with pillar-filter

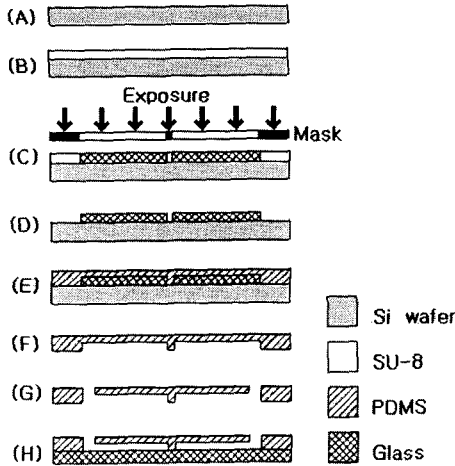


Fig. 3 Schematic of fabrication process

이와 같은 항원항체반응 유무를 검사하기 위한 마이크로 바이오칩의 개념도는 Fig. 2 와 같다. PDMS REM 에 의한 바이오칩 제작에 있어서는 칩 기판(substrate)이 필요한데, 생화학적 안정성과 반응 검출이 용이한 유리 기판을 사용하였다.

2.2 형상 및 치수

고가의 항원 항체 시약이 소량 요구되는 바이오칩을 제작하기 위해서는 되도록 작은 비드를 사용하여야 한다. 그리고 필터기둥의 간격은 사용되는 마이크로 비드를 걸러낼 수 있도록 설계되어야 한다. 제작 가능한 필터기둥의 최소 간격은 마이크로 필터 구조물 가공시 사용되는 공정용 마스크의 정밀도에 의해 좌우된다. 정밀도는 떨어지나 적은 비용이 드는 필름 마스크를 이용하기로 하고, 필터 간격은 필름 마스크로 최소 가능한 크기인 20 μm로 하였다. 그리고 비드가 필터를 통과하지 못하도록, 직경이 약 30 ~ 50 μm 인 마이크로 비드(Pierce biotechnology 사 Ultralink)를 사용하였다. 필터 앞 채널 챔버는 소량의 시료로도 반응이 가능하도록 체적을 1.5~2.7 μl로 설정하여, 챔버의 너비는 2~4.5 mm로 높이는 ~70 μm로 설계하였다.

마이크로 채널 내의 필터 부근에서는 챔버와 필터 사이에서 발생하는 유로 단면적 축소에 의해 압력증가가 발생하여 PDMS 기둥필터가 유리기판과 떨어질 수 있으므로 증가하는 압력과 기둥 단면적의 관계를 적절히 조절할 필요가 있다. 그리고 PDMS 는 탄성계수(약 3~9x10⁹ Pa)가 낮아 압력이 적정수준 이상 커질 경우 굽힘 변형이 발생될 확률이 높다.⁽⁶⁾ 변형이 발생되면 20 μm로 설계된 기둥간격이 변화되어 필터의 기능을 수행하지 못 할 가능성이 있다.

굽힘 변형의 최소화는 기둥 구조물의 높이와 단면형상의 변경을 통해 모색할 수 있다. 일반적으로 같은 단면적에 대해서 단면의 굽힘 관성모멘트가 커짐에 따라 굽힘 변형량을 최소화 할 수 있다. 동일 단면적 하에서 가장 큰 관성모멘트 값을 갖는 단면형상은 정사각형이다. 하지만 SU-8 몰드 위의 PDMS 을 충전할 때나 경화 후 PDMS 을 박리(peeling) 시, 기둥 단면 형상이 원형일 때가 파손이 제일 안 되는 것을 실험을 통해 알 수가 있었다. 동일한 단면적에 대해서 정사각형 대 원형 관성모멘트의 비가 약 1 : 0.95 로 큰 차이를 보이지 않는다. 따라서 기둥 단면형상을 파손 방지와 필터 내 원활한 유체유동을 고려하여 직경이 약 100 μm인 원형으로 설계하였다. 그리고 보다 효율적인 필터 효과를 위해, 필터기둥 배열을 2 열 구조로써 각 열의 기둥간 틈새 위치가 앞과 뒤 열이 서로 엇갈리게 설계하였다.

3. 바이오칩 제작 및 결과

3.1 마이크로머시닝에 의한 제작

Fig. 3 은 PDMS REM 에 의한 바이오칩의 전반적인 제작순서를 나타낸다. 실리콘 웨이퍼[Fig. 3(A)] 위에 음성감광제(negative photoresist)인 SU-8 을 스핀코팅(spin coating) 한다[Fig. 3(B)]. 포토리소그래피(photo lithography)를 수행하여[Fig. 3(C)], 복사용 몰드(replica mold)를 만든다[Fig. 3(D)]. PDMS 복사물(replica)의 제작은 PDMS 와 경화제를 10:1로 혼합하고 진공오븐에서 기포를 제거한 뒤 제작된 SU-8 몰드 위에 붓고 경화시킨다[Fig. 3(E)]. 경화된 PDMS 를 몰드로부터 분리한다[Fig. 3(F)]. 분리된 PDMS 에 펀치로 구멍가공을 하여 마이크로 채널 내의 시료 주입구(inlet)와 배출구(outlet)를 만든다[Fig. 3(G)]. 구멍가공된 PDMS 를 산소 플라즈마(O₂ plasma)로 표면처리 한 후 유리 기판과 접합(bonding)시킨다[Fig. 3(H)]. 플라즈마 처리는 RIE(reactive ion etching) 장비와 테슬라 코일(tesla coil)을 이용하였다.

마이크로 채널 및 기둥필터의 높이를 정확히 제작하기 위해서는, Fig. 3(B) 과정에서 원하는 높이로 감광제 SU-8 을 스핀코팅을 할 수 있어야 한다. 감광제 스핀코팅시 기판 위에 도포되는 감광제 두께는 일반적으로 스핀속도에 의해 결정된다. 채널 및 기둥필터 높이인 약 70 μm로 감광제를 스핀코팅을 할 수 있는 조건을 알기 위해 다양한 스핀속도에 대한 감광제(SU-8 50) 도포 두께 변화를 측정하여 Fig. 4 와 같은 결과를 얻었다. SU-8 몰드를 이용하여 제작된 최종 바

이오칩은 Fig. 5(a)와 같으며, 주입구로부터 배출구까지의 마이크로 채널의 총 길이는 28.5 mm이다. 그리고 Fig. 5(b)는 전자주사현미경 (SEM)으로 제작된 기둥필터를 확대하여 찍은 사진이다.

3.2 마이크로 필터 성능평가

면역분석 실험을 수행하기에 앞서 제작된 마이크로 기둥 필터의 특성을 평가하였다. 기둥 구조를 갖는 필터의 경우 유로 단면적의 급격한 변화로 인해 압력의 증가가 발생한다. 이때 적정수준 이상으로 압력이 증가하면, 기둥구조가 파손되거나 변형될 수도 있다. 이때 압력증가는 유로 단면적 변화율과 유속에 관계한다. 따라서, 파손을 피할 수 있는 적정유량을 알아보기 위해 유량범위 0.5~8.0 ml/min의 탈이온수를 마이크로 비드 없이 마이크로 채널 내에 주입하면서, 기둥필터의 변형을 현미경을 통해 살펴보았다.

각각의 유량에 대해서 관찰된 기둥필터의 변형은 Table 1 과 같다. 유량이 증가함에 따라 기둥간격이 증가하는 것을 보이고 있다. 이는 압력증가로 인해 PDMS 챔버가 확장 변형됨에 따라 기둥이 높이 방향으로 신장되어 기둥단면이 작아져 기둥간격이 커지게 된 것이다. 변형이 일정수준 이상 증가하면 최소 입자인 30 μm의 마이크로 비드를 걸러내지 못하게 되므로 필터의 중요 성능인 여과 효율이 저하된다. 유량이 점점 커지다가 8.0 ml/min 되면 필터가 파손됨이 관찰되었다. 따라서, 제작된 마이크로 필터로 최소 직경이 30 μm인 마이크로 비드를 필터링할 수 있는 적정 유량은 약 3.0 ml/min 이하로 판명되었다.

4. 면역분석 실험

제작된 바이오칩을 이용하여 실제 항원항체반응 실험을 수행하였으며, 그 결과는 Fig. 6 과 같다. 간염에 대한 항체의 유무 판단에 사용되는 HBsAg (hepatitis B virus surface antigen)가 실험시료로 사용되었다. 먼저 바이오틴(biotin)이 표지(label)된 HBV(hepatitis B virus) 단일클론성 항체(Ag1)를 streptavidin 이 코팅된 마이크로 비드에 고정시켰다.

이렇게 항체가 고정된 마이크로 비드 200 μl를 취하여 1 ml/min의 속도로 바이오칩에 주입하였다. 250 μl의 PBS 완충액 (buffer)를 추가로 주입하고 2 회 세척한 뒤, 마이크로 비드들이 필터에 의해

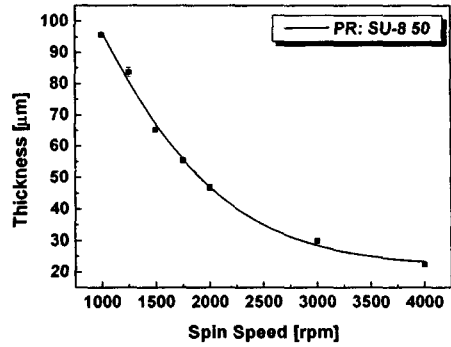


Fig. 4 PR thickness as a function of spin coating speed

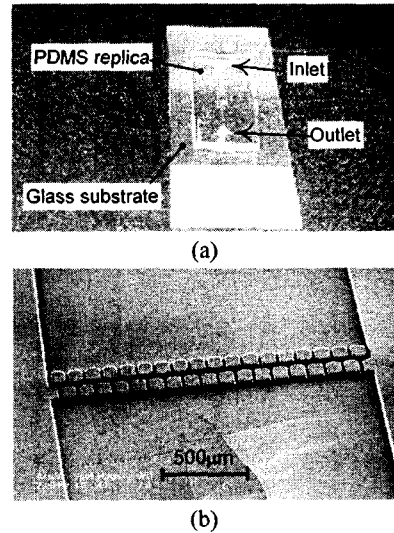


Fig. 5 (a) Photograph of biochip and (b) SEM image of micro pillar-filter

Table 1 Dimension changes of filter with flow rate

Flow rate (ml/min)	Diameter of pillar (μm)	Gap of pillars (μm)
0.0	100.00	20.00
0.5	99.19	21.63
3.0	98.76	22.49
5.0	97.02	25.95
6.0	95.59	26.82

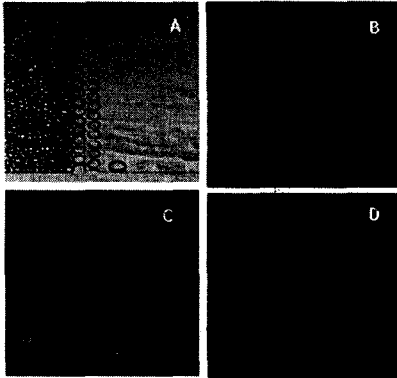


Fig. 6 Normal and fluorescent images of the beads in the chip: (a) beads are filtered by the filter, (b) injection of FITC-HBs Ab, (c) 40X fluorescence image after washing, (d) 40X fluorescence image after elution

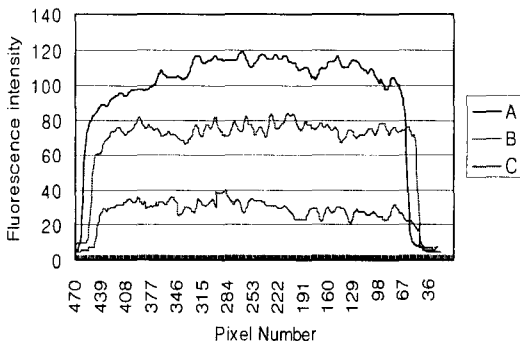


Fig. 7 Fluorescence intensity lines scanned across the chamber before the pillar-filter: (a) before washing, (b) after washing, and (c) after elution

필터 앞 챔버 내에 잘 모여졌는지를 광학 현미경으로 40 배 배율로 관찰하였다[Fig. 7(a)].

마이크로 비드가 필터링되어 있는 바이오칩에 625 ng/ml B 형 간염 바이러스 항원(HBsAg) 이 6.7 μ l/min 의 속도로 주입되었다. 추가로 항원(HBsAg) 검출을 위해 형광물질 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 부착된 HBV 항체(Ag8)가 6.7 μ l/min 의 속도로 주입되었다[Fig. 6(b)]. 250 μ l의 PBS 완충액을 추가로 주입하여 2 회 세척한 뒤, CCD 카메라(Toshiba IK642F)가 장착된 형광현미경(epi-fluorescence microscope; Nikon Diaphot 300)을 사용하여 배율 40 배에서 형광 세기를 관찰하였다[Fig. 6(c)]. 최종적으로 200 μ l의 0.1M glycine-HCl 완충액 200 μ l를 주입하여 마이크로 비드에 부착되어 있는 항원항체 반응체를 용리

(elution)시켰다[Fig. 6(d)].

Fig. 7 은 촬영된 형광사진을 영상(image) 분석 프로그램(UTHSCSA)을 사용하여 그레이스케일(gray scale)로 변환한 뒤 이를 수치화한 결과이다. 데이터 A 는 항원항체반응 검출용 형광물질을 바이오칩에 주입한 직 후에[Fig. 6(b)], 데이터 B 는 완충액으로 세척한 후에[Fig. 6(c)], 데이터 C 는 형광물질을 모두 제거한 후에[Fig. 6(d)] 순차적으로 측정된 형광밀도 (fluorescence intensity)이다. 본 실험은 항원항체반응이 확실히 일어나는 경우를 설정하여 수행한 결과로서, 항원항체반응이 발생하는 경우에는 데이터 B 가 60 이상이 됨을 알 수가 있다. 따라서 미지의 샘플에 대해서 항원항체반응 유무를 검사할 경우, B 신호를 측정하여 나온 형광밀도가 60 이상이며 항원항체 반응이 일어나는 것으로, 반대로 60 미만이며 항원 항체반응이 안 일어나는 것으로 판단하면 될 것이다. 본 실험에 사용된 시료들의 양은 기존 방법인 일반 시험관으로 수행할 경우보다는 적은 약 100 μ l이었고, 분석에 소요된 시간은 30 분 정도로 기존의 방법에 비해 50% 이상 단축된 것이었다. 그러나 요즈음 well-plate 에서 자동화된 장비를 이용하면 100 μ l 이하의 적은 시료 양에서도 면역분석이 가능한 것을 고려해 볼 때에, 보다 적은 양의 시료로 면역분석이 가능 하도록 칩 성능 개선을 위한 연구가 필요하겠다.

5. 결 론

본 연구에서는 분자생화학 분야에서 중요하게 수행되고 있는 면역분석을 보다 효율적으로 수행할 수 있는 바이오칩을 제작하였다. 되도록 값싼 바이오칩을 개발하고자, SU-8 감광제 모델을 이용하여 PDMS 폴리머로 칩을 제작하였다. 효과적인 면역 분석을 위해 마이크로 비드와 필터를 사용하는 샌드위치법으로 항원항체반응 유무를 검출하였다. 크기가 약 30~50 μ m인 비드를 사용하였고, 기동 필터의 간격은 20 μ m가 되게 마이크로 칩을 만들었다. 바이오칩 내로 시료의 주입 유량이 너무 커지면 기동필터가 변형되어 면역분석에 문제가 발생함을 실험을 통해 확인하고, 안전하게 면역 분석이 이루어질 수 있는 3.0 ml/min 이하의 유량에서 실험을 수행하였다.

제작된 마이크로 바이오칩을 이용하여 면역분석 실험을 수행한 결과 100 μ l의 시료로 30 분 이내의 짧은 시간에 형광신호를 통해 항원-항체 반응결과를 검출할 수 있었다. 본 바이오칩은 차세대 면역 분석용으로서의 충분한 가능성을 보여주었다

참고문헌

- (1) Kim, J. K., Chung, C., Chang, J. K. and Yoo, J. Y., 2003, "Analysis of Fully Developed Multilayer Flow in Microchannel with a Rectangular Cross Section," *Trans. of the KSME (B)*, Vol. 27, No. 5, pp. 644-654.
- (2) Lee, D., Maeng, J.-S., Choi, H.-I. and Na, W., 2003, "Predictions of Microscale Separated Flow using Langmuir Slip Boundary Condition," *Trans. of the KSME (B)*, Vol. 27, No. 8, pp. 1097-1104.
- (3) Manz, A. and Becker, H. Eds., 1999, *Microsystem Technology in Chemistry and Life Sciences*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 10.
- (4) Hatch, A., Kamholz, A. E., Hawkins, K. R., Munson, M. S., Schilling, E. A., Weigl, B. H. and Yager, P., 2001, "A Rapid Diffusion Immunoassay in a T-sensor," *Nat. Biotechnol.*, Vol. 19, pp. 461-465.
- (5) Sato, K., Tokeshi, M., Kimura, H. and Kitamori, T., 2001, "Determination of Carcinoembryonic Antigen in Human Sera by Integrated Bead-Bed Immunoassay in a Microchip for Cancer Diagnosis," *Anal. Chem.*, Vol. 73, pp. 1213-1218.
- (6) Andersson, H., Van der Wijngaart, W., Enoksson, P., Stemme, G., 2000, "Micromachined Flow-through Filter-Chamber for Chemical Reactions on Beads," *Sens. Actuators B*, Vol. 67, pp. 203-208.
- (7) Seong, G. H. and Crook, R. M., 2002, "Efficient Mixing and Reactions within Microfluidic Channels Using Microbead - Supported Catalysts," *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 124, pp. 13360-13361.
- (8) Armani, D., Liu, C., Aluru, N., 1999, "Reconfigurable Fluid Circuits by PDMS Elastomer Micro-maching," *Proceedings of IEEE MEMS, IEEE*, Washington DC, pp. 222-227.