

강화된 자기장 구배 하에서 나노자성입자를 이용한 미세유체 기반의 면역 측정

한영기 · 강주현 · 김규성 · 박제균[†]

Microfluidic immunoassay using superparamagnetic nanoparticles in an enhanced magnetic field gradient

Young Ki Hahn, Joo H. Kang, Kyu Sung Kim, and Je-Kyun Park[†]

Abstract

This paper reports a novel immunoassay method using superparamagnetic nanoparticles and an enhanced magnetic field gradient for the detection of protein in a microfluidic device. We use superparamagnetic nanoparticles as a label and fluorescent polystyrene beads as a solid support. Based on this platform, magnetic force-based microfluidic immunoassay is successfully applied to analyze the concentration of IgG as model analytes. In addition, we present ferromagnetic microstructure connected with a permanent magnet to increase magnetic flux density gradient (dB/dx , $\sim 10^4$ T/m), which makes limit of detection reduced. The detection limit is reduced to about 1 pg/mL.

Key Words : microfluidics, immunoassay, magnetic nanoparticles

1. 서 론

최근 들어 바이오센서(biosensor), DNA 칩, 단백질 칩 등의 초소형 분석기기를 이용하여 기존에 노동 집약적이던 시료의 전처리 과정이나 반응 시간 등을 줄이려는 기술이 주목을 받고 있다. 랩온어칩(lab-on-a-chip) 또는 μ TAS(micro total analysis system)라고 일컬어지는 이런 기술들은 마이크로플루이딕스(microfluidics)를 기반으로 하고 단백질, DNA와 같은 생체분자(analyte)의 분리, 분석을 목적으로 하고 있다^[1].

이 중에서도 마이크로 크기의 비드(bead)를 이용하는 분석방식의 경우 많은 장점을 가지고 있어 활발한 연구가 진행되고 있다. 비드는 일반적인 평면 칩 분석 방식보다 넓은 표면적을 가지고 있어 보다 효율적으로 생화학적 반응을 수행할 수 있다. 또한, 자성을 띠는 나노 크기의 비드를 사용하면 특별한 장치없이 외부 자기장만으로 비드를 분리할 수 있다는 장점이 있다^[2-4]. 특히, 본 연구에서 사용한 나노자성입자는 강자성체의

성질을 지닌 single domain magnetic dipoles을 가지기 때문에 외부 자기장 없이는 영구자장 극이 형성되지 않아 비드끼리 뭉치는 현상을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 비드 표면에 생체분자를 쉽게 결합시킬 수 있고 생체친화적(biocompatibility) 이어서 생화학적 반응에 적합하다^[5].

본 연구 그룹에서는 마이크로채널 안에서 자기력을 이용하여 생체분자를 검출해내는 새로운 검출 방법을 개발 보고한 바 있다^[6]. 그 검출의 원리를 마이크로채널 안에서는 유체 흐름이 층류 흐름을 보이기 때문에 나노자성체와 결합한 마이크로비드만이 마이크로채널 안에서 자기장 구배가 높은 쪽으로 편향됨을 이용하는 것이다(그림 1). 즉, 마이크로비드와 결합한 나노자성체의 개수가 많아지면 그에 비례하여 편향되는 속도가 증가하므로 마이크로채널 내에서 마이크로비드의 속도를 측정함으로써 궁극적으로 검출하고자 하는 생체분자의 농도를 알아 낼 수가 있다^[6-7]. 본 논문에서는 이러한 미세유체 기반 측정시스템의 감도를 향상시키기 위해서 강자성체인 니켈을 도입하여 측정의 감도를 향상시키는 연구를 진행하였다. 편향되는 입자의 속도는 인가된 자기장 구배에 비례하기 때문에 니켈구조를 이

한국과학기술원 바이오시스템학과 (Department of BioSystems, KAIST)

[†]Corresponding author: jekyun@kaist.ac.kr

(Received : January 13, 2006, Accepted : January 26, 2006)

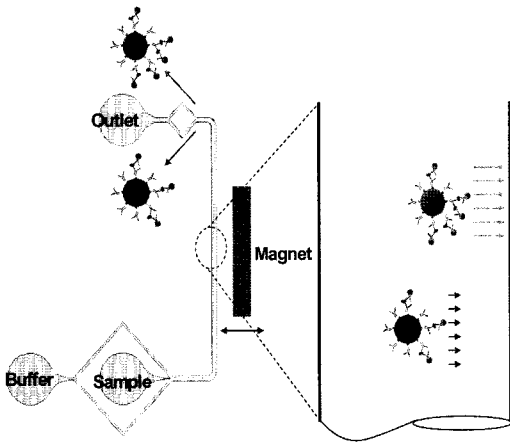


그림 1. 미세유체 기반 면역 분석방법의 원리
 Fig. 1. Principle of microfluidic immunoassay using microbeads conjugated with superparamagnetic nanoparticles.

용하게 되면 영구자석의 자기장을 집중시켜 자기장 구배를 더욱 높일 수 있기 때문이다^[8].

2. 이 론

마이크로 단위의 채널에서는 유체가 층류 흐름(laminar flow)을 유지하면서 흐르기 때문에 마이크로 비드에는 흐르는 방향에 수직인 면으로는 작용하는 힘이 없다. 그러나 나노자성입자가 붙은 비드들이 외부 자기장에 노출되면 높은 자기장 구배 방향으로 힘을 받아 비드들이 움직이게 되어 분리가 된다. 이 때, 비드가 받는 힘은 다음 식(1)에 의해 결정된다.

$$F = N_{sm} F_{sm} = \frac{1}{2} N_{sm} \frac{V_{sm} \Delta \chi_{sm}}{\mu_0} \nabla B^2 \quad (1)$$

여기서, N_{sm} 은 마이크로비드에 붙은 나노자성입자의 개수, V_{sm} 은 나노자성입자의 부피, χ_{sm} 은 자화율(susceptibility), μ_0 은 진공 투자율(vacuum permeability), ∇B 는 자기장 구배(magnetic field gradient)를 나타낸다. 비드가 영구자석 방향으로 움직이게 되면 반대 방향으로 다음 식(2)와 같은 Stokes' drag force를 받게 된다.

$$F_D = -6\pi R_M \eta v \quad (2)$$

여기서 R_M 은 마이크로비드의 반지름, η 은 유체의 점도, v 는 자기력에 의해 끌려오는 비드의 속도이다. 자기력 방향이 유체 흐름 방향에 수직이고 층류 흐름이

므로 F_D 와 F 는 크기가 같다. 그러므로 최종 끌려오는 비드의 속도는 아래 식(3)과 같이 표현된다.

$$v = \frac{N_{sm} V_{sm} \Delta \chi_{sm}}{12\pi R_M \eta \mu_0} \nabla B^2 \quad (3)$$

이 때, 나노자성입자의 크기가 모두 동일하다면 부피와 자화율이 일정하기 때문에 끌려오는 비드의 속도는 자기장 구배와 마이크로비드에 붙은 나노자성입자 개수에만 영향을 받게 된다. 낮은 농도의 생체분자가 있을 경우는 마이크로비드에 붙게 되는 나노자성입자 개수가 적어져 편향되는 속도가 느려지고 결국 감도 면에서 좋은 결과를 얻을 수 없다. 이를 보완하기 위해 본 연구에서는 니켈 미세구조를 도입하여 자기장 구배를 강화시켰다. 자기장 구배의 증가에 의해 편향되는 비드의 속도를 증가시킬 수 있기 때문이다. 즉, 강자성체인 니켈과 같은 물질은 외부에 있는 자기장을 강자성체 내부로 집중하려는 성질을 가지고 있기 때문에 결과적으로 니켈 구조 외부에 강한 자기장 구배를 만들 수 있게 된다. 이와 같은 조건하에서는 상자성을 띠는 입자의 경우 자기장 구배가 큰 쪽으로 끌려오게 되는 반면, 반자성을 띠는 입자는 구배가 작은 쪽으로 끌려가게 된다.

3. 재료 및 방법

3.1. 미세유체채널 소자의 설계

니켈 미세구조물을 이용하여 자기장 구배를 높인 미세유체소자는 그림 2와 같다. 버퍼와 면역반응으로 결합된 비드가 들어가게 되는 두 개의 입구와 비드들이 자기장에 노출되게 되는 마이크로채널, 그리고 출구로

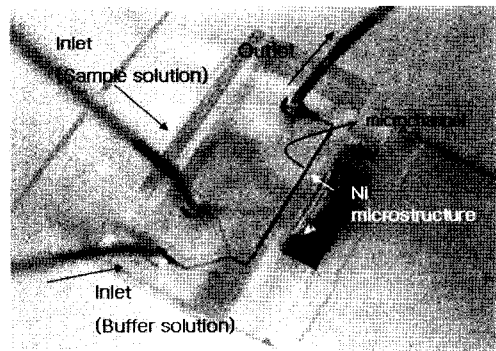


그림 2. 니켈 미세구조가 있는 미세유체소자 사진
 Fig. 2. Picture of the microfluidic device with Ni microstructure.

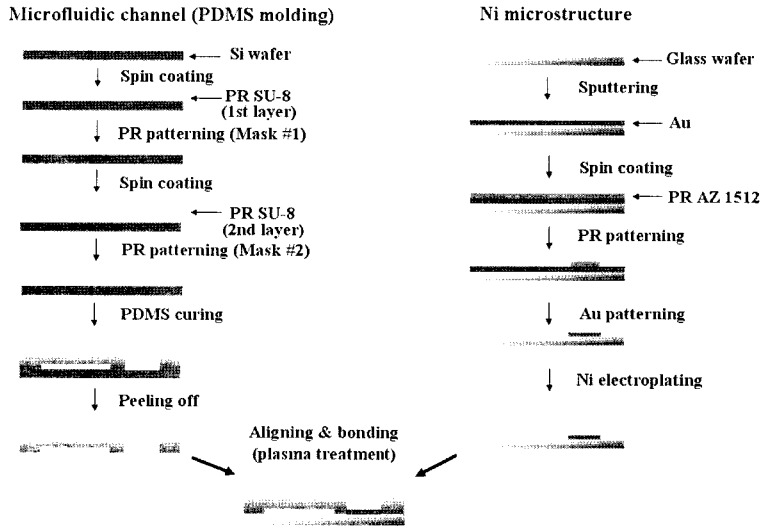


그림 3. 니켈 미세구조물이 있는 미세유체소자의 제작 공정
 Fig. 3. Fabrication process of microfluidic device with Ni microstructure.

구성되어 있다. 위쪽 입구로는 비드가 들어있는 용액이 들어가게 되고 아래쪽 입구로는 퍼져 용액이 들어간다. 두 용액이 만나는 지점에서 비드들은 유압에 의해 한 쪽 벽면으로 포커싱되게 된다. 포커싱된 비드들은 폭 100 μm , 높이 10 μm 인 채널을 따라 흐르게 되고 15 μm 떨어진 지점에 폭 50 μm , 높이 50 μm 인 니켈 미세구조를 위치하도록 함으로써 자기장에 노출되어 편향되게 하였다. 편향된 비드들의 위치를 보다 정확히 측정하기 위해 출구 부분에는 확장 영역을 제작하였다.

3.2. 제작방법

Poly(dimethylsiloxane)(PDMS)를 이용하여 미세가공 공정 중 한 방식인 미세주형 공정(micromolding process)을 통해 마이크로채널 구조물을 제작하였고, 만들어진 PDMS 채널은 플라즈마(plasma) 처리를 통해 유리 기판에 접합시켰다. 또한, 자기장 구배를 높일 수

있는 니켈 미세구조물은 그림 3에서 보는 것처럼 유리 기판위에 도금 공정을 이용하여 제작되었고, 그 위에 미세주형 공정을 통해 만들어진 PDMS 채널을 접합시켜 완성하였다.

3.3. 미세입자 준비 및 면역반응

자기력 기반의 면역측정 실험을 하기 위해 1 μm 형광 비드와 50 nm 크기의 나노자성입자가 준비되었다. 면역반응을 하기 전에 폴리스티렌(polystyrene) 재질의 형광 비드에 rabbit IgG가 비특이적으로 붙는 현상을 방지하기 위해 카제인(casein)을 이용하여 비드 표면을 코팅하였다. 형광 비드에는 avidin이 붙어 있어 biotin이 붙어 있는 goat monoclonal anti-rabbit IgG를 붙인 다음 rabbit IgG를 결합시킨 후 나노자성입자가 붙어 있는 goat polyclonal anti-rabbit IgG를 최종적으로 붙임으로써 샌드위치 면역결합을 수행하였다(그림 4). 이

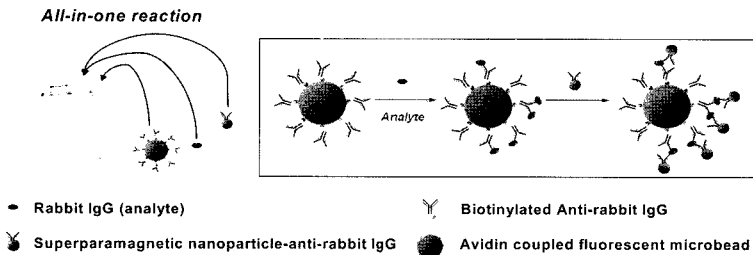


그림 4. 마이크로비드와 나노자성체가 부착된 시료간의 면역반응 도식도
 Fig. 4. Immunological sample preparation procedures using fluorescent microbeads and nanoparticle-conjugated analytes.

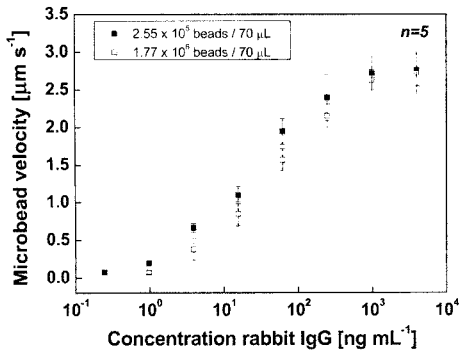


그림 5. Rabbit IgG를 검출해 내기 위한 미세유체 채널 내에서의 자기력 기반 면역측정 결과
 Fig. 5. Results of magnetic force-based microfluidic sandwich immunoassay for detection of rabbit IgG.

렇게 만든 마이크로비드 결합체는 PBS(phosphate buffered saline) 완충용액에 준비하고 비드가 들어 있는 유체를 시린지 펌프를 이용하여 미세유체소자에 주입하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1. 영구자석 자기장하에서의 결과

영구자석 자기장하에서 편향되는 마이크로 채널 안의 형광 비드 움직임은 CCD 카메라를 이용하여 관찰하고 rabbit IgG 농도에 따른 비드의 속도를 분석하였다. 그림 5에서 보는 것처럼 형광 비드의 농도를 두 가지 경우로 달리하였다. 비드의 농도가 적은 경우는 한 비드 당 결합하는 IgG의 수가 증가되어 결국 결합하는 나노자성체의 개수가 많아지므로 이론에서 예상된 편향되는 속도가 증가하는 결과를 얻을 수 있었다. 이 시스템의 IgG 측정 가능 농도 범위는 244 pg/mL(1.5 pM)에

서 1 μg/mL(6.25 nM)이고 최고농도와 최저농도일 때의 편향되는 비드의 속도는 각각 $2.69 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$, $0.1 \pm 0.02 \mu\text{m/s}$ 였다. IgG의 농도가 약 1 μg/mL에서 비드의 속도가 더 이상 증가되지 않고 포화되는 현상을 보였는데 이는 IgG가 붙게 되는 형광 비드 표면이 제한된 것으로 해석할 수 있다.

4.2. 니켈 미세구조 도입에 대한 시뮬레이션 결과

자기장 구배를 강화시키기 위하여 니켈 미세구조를 도입하였다. 이를 이론적으로 입증하고 영구자석에 비하여 얼마나 자기장 구배가 강화되는지를 FEMM 시뮬레이션을 통하여 알아보았다¹⁸⁾. 먼저, 영구자석만 있을 경우 자석으로부터 약 2 mm 떨어진 마이크로채널이 위치한 거리에서 약 200 T/m의 자기장 구배가 형성되는 것을 확인하였다(그림 6(a)). 그러나 니켈 미세구조를 도입한 경우에는 그림 6(b)에서 보는 것처럼 이보다 약 50배 정도 강화된 -10^4 T/m 의 값을 얻을 수 있는 것을 확인하였다. 이 결과를 토대로 하여 본 연구에 사용된 미세유체소자가 제작되었다.

4.3. 니켈 미세구조물로 강화된 자기장하에서의 결과

니켈 미세구조물이 포함된 미세소자를 이용하여 좀 더 낮은 농도의 IgG를 분석하였다. 영구자석에서 나오는 자기장이 공기 중으로 나올 때와는 달리 니켈과 같은 강자성체가 있을 경우 그 부분으로 집중이 되기 때문에 높은 자기장 구배를 얻을 수 있다. 식(3)에서 보는 것처럼 편향되는 비드의 속도는 나머지 변수가 일정할 때 마이크로비드에 붙게되는 나노자성입자의 개수(N_m)와 자기장 구배(∇B^2)에 의해 영향을 받게 된다. 또한, 영구자석만으로 실험한 소자의 경우는 영구자석과 미세채널과의 거리가 2 mm이었지만 니켈 미세구조를 도입한 소자에서는 니켈 미세구조와 미세채널 사이

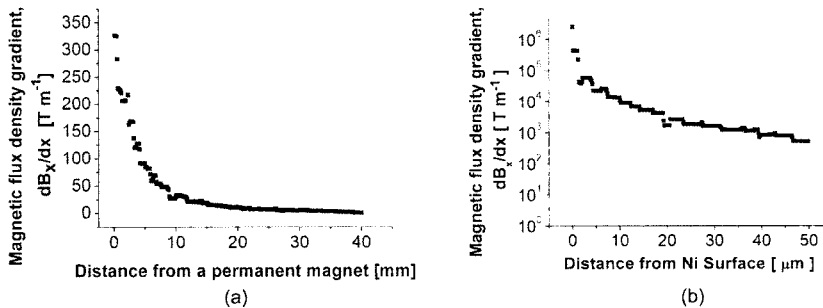


그림 6. FEMM을 통해 계산된 자기장 구배 결과: (a) 영구자석의 자기장 구배 (b) 니켈 미세구조에서의 자기장 구배
 Fig. 6. Results of the calculated magnetic field gradient via FEMM: (a) Magnetic field gradient of a permanent magnet (b) Magnetic field gradient of Ni microstructure.

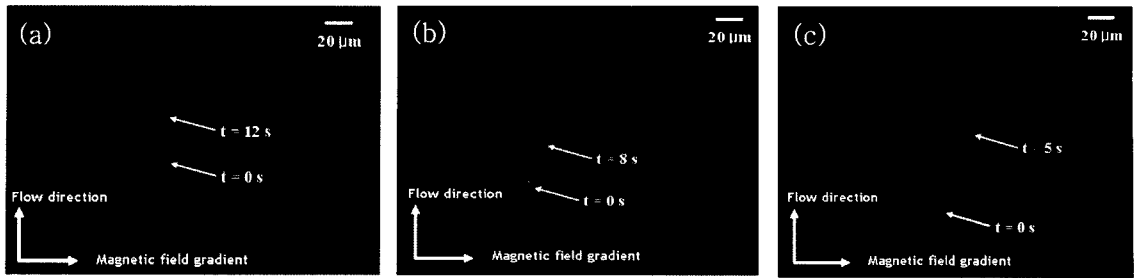


그림 7. 강화된 자기장 구배하에서의 면역반응으로 결합된 비드의 움직임: (a) 컨트롤 실험, (b) IgG의 농도 4 pg/mL일때의 실험(속도: $1.31 \pm 0.35 \mu\text{m/s}$), (c) IgG의 농도 200 pg/mL일때의 실험(속도: $6.22 \pm 0.33 \mu\text{m/s}$)
 Fig. 7. CCD images of movements of reacted fluorescent microbeads under an enhanced magnetic field gradient: (a) Control experiment, (b) Experiment with 4 pg/mL of rabbit IgG(velocity: $1.31 \pm 0.35 \mu\text{m/s}$), (c) Experiment with 200 pg/mL of rabbit IgG (velocity: $6.22 \pm 0.33 \mu\text{m/s}$).

의 거리는 $15 \mu\text{m}$ 이기 때문에 영구자석에서 나오는 자기력선이 니켈 미세구조에 집속되게 되면 자기장 구배 뿐만 아니라 자기력도 그 만큼 증가하게 된다. 시뮬레이션 결과 니켈 미세구조가 있는 지점의 자기력을 비교해보면 약 4~5배 정도 증가된 것을 확인할 수 있었다(결과 생략). 따라서 최종적으로 식(3)에서 보면 ∇B^2 는 $\nabla B \cdot B$ 로 볼 수 있으므로 자기장 구배 50배 증가와 자기력의 4~5배 증가로부터 검출 한계가 약 200~250배 증가하게 될 것으로 기대할 수 있다. 실제 이 시스템으로 농도별 IgG를 분석한 결과 그림 7에서와 같았다. 자기장에 노출되었을 때 CCD 카메라를 통해서 얻은 비드의 움직임에서 알 수 있듯이 이전의 영구자석의 자기장 구배만 있을 때보다 약 250배 정도 낮은 농도의 IgG를 감지할 수 있어 펨토몰(femtomole) 근처까지 분석이 가능하였다.

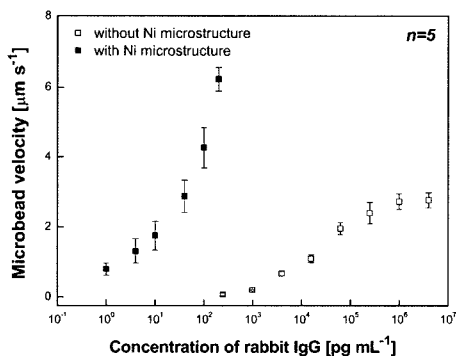


그림 8. 니켈 미세구조가 포함된 소자와 니켈 미세구조가 없는 소자에서의 rabbit IgG 분석결과
 Fig. 8. Results of detection for IgG using the microfluidic devices with Ni microstructure and without Ni microstructure.

측정 가능 범위는 최고농도 200 pg/mL(1.23 pM)에서 최저농도 1 pg/mL(6.65 fM)이었고, 최고농도와 최저농도일 때의 편향되는 비드의 속도는 각각 $6.22 \pm 0.33 \mu\text{m/s}$, $0.79 \pm 0.17 \mu\text{m/s}$ 로 측정되었다(그림 8). 그림 8에 측정된 결과 값은 2.55×10^5 beads/ $70 \mu\text{L}$ 의 비드 농도로 실험한 결과이며 이를 이전의 영구자석만을 이용한 실험 결과와 비교 분석하였다.

5. 결 론

본 연구에서는 미세유체 채널 내에서 수행되는 자기력 기반의 면역 분석방법의 감도를 높이기 위하여 강자성체인 니켈을 이용한 미세유체소자를 제작하여 그 특성을 비교 분석하였다. 실험결과 니켈구조가 도입된 소자의 경우 그렇지 못한 소자의 경우보다 약 250배 정도감도 증진의 효과를 가져왔다. 검출 가능한 범위는 최고농도 200 pg/mL에서 최저농도 1 pg/mL로 측정되었다.

이 검출 시스템에서 여러 가지 형광으로 인코딩된 마이크로비드를 사용하게 되면 다중 면역검출 시스템으로 개발이 가능하다. 각각 인코딩된 비드에 각기 다른 항체를 고정시키고 여러 항원이 들어있는 용액을 반응시키게 되면 한 번의 반응으로 여러 생체분자를 검출할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 나노원천기술개발사업(M10503000218-05M0300-21810)의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고 문헌

- [1] L. Mazzola, "Commercializing nanotechnology", *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 1137-1143, 2003.
- [2] M. A. Hayes, N. A. Polson, A. N. Phayre, and A. A. Garcia, "Flow-based microimmunoassay", *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 5896-5902, 2001.
- [3] N. Pamme and A. Manz, "On-chip free-flow magnetophoresis: Continuous flow separation of magnetic particles and agglomerates", *Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 7250-7256, 2004.
- [4] J. W. Choi, K. W. Oh, J. H. Thomas, W. R. Heine-man, H. B. Halsall, J. H. Nevin, A. J. Helmicki, H. T. Henderson, and Chong H. Ahn, "An integrated microfluidic biochemical detection system for protein analysis with magnetic-bead based sampling capabilities", *Lab Chip*, vol. 2, pp. 27-30, 2002.
- [5] I. Šafařík and M. Šafaříková, "Magnetic nanoparticles and biosciences", *Monatshfte für Chemie*, vol. 133, pp. 737-59, 2002.
- [6] K. S. Kim and J.-K. Park, "Magnetic force-based multiplexed immunoassay using superparamagnetic nanoparticles in microfluidic channel", *Lab Chip*, vol. 5, pp. 657-664, 2005.
- [7] M. Zborowski, C. B. Fuh, R. Green, L. Sun, and J. J. Chalmers, "Analytical magnetophoresis of ferritin-labeled lymphocytes", *Anal. Chem.*, vol. 67, pp 3702-3712, 1995.
- [8] D. C. Meeker, "Finite Element Method Magnetics", FEMM, <http://femm.berlios.de>.



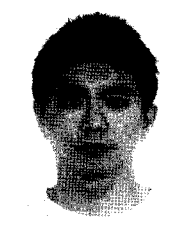
한 영 기 (Young Ki Hahn)

- 2004년 서강대학교 화학공학과 졸업 (공학사)
- 2006년 한국과학기술원 바이오시스템학과 졸업(공학석사)
- 현재 한국과학기술원 바이오시스템학과 박사과정
- 주관심분야 : BioMEMS



강 주 현 (Joo H. Kang)

- 2002년 서강대학교 화학공학과(공학사), 생명과학과 졸업(이학사)
- 2004년 한국과학기술원 바이오시스템학과 졸업(공학석사)
- 현재 한국과학기술원 바이오시스템학과 박사과정
- 주관심분야 : BioMEMS



김 규 성 (Kyu Sung Kim)

- 2002년 연세대학교 재료공학부 졸업 (공학사)
- 2005년 한국과학기술원 바이오시스템학과 졸업(공학석사)
- 현재 하이닉스반도체 메모리연구소 연구원
- 주관심분야 : BioMEMS



박 제 균 (Je-Kyun Park)

- 1986년 서울대학교 식품공학과 졸업 (농학사)
- 1988년 서울대학교 식품공학과 졸업 (농학석사)
- 1992년 한국과학기술원 생물공학과 졸업 (이학박사)
- 현재 한국과학기술원 바이오시스템학과 부교수
- 주관심분야 : 나노바이오센서, BioMEMS, Microfluidics