

DNA 의 제한효소 반응 및 전기영동 검출용 PDMS/유리 마이크로바이오칩

최준영* · 안유민† · 황승용**

(2005년 6월 28일 접수, 2005년 12월 8일 심사완료)

PDMS/Glass Based DNA Microbiochip for Restriction Enzyme Reaction and Electrophoresis Detection

Joon-Young Choi, Yoomin Ahn and Seung-Yong Hwang

Key Words : DNA(디옥시리보핵산), Restriction Enzyme(제한효소), Electrophoresis(전기영동), Microbiochip(초소형 생체칩)

Abstract

This paper reports low-cost PDMS/glass based DNA microbiochip for the restriction enzyme reaction and its products detection using the capillary electrophoresis. The microbiochip (25mm × 75mm) has the heater integrated reactor (5 μl) for DNA restriction enzyme reaction at 37°C and the microchannel (80 μm × 100 μm × 58mm) for the capillary electrophoresis detection. It is experimentally confirmed that the digestion of the plasmid (pGEM®-4Z) by the enzyme (Hind III and Sca I) is performed for less than 10 min and its electrophoresis detection is able to sequentially on the fabricated microbiochip.

1. 서론

멤스(MEMS, microelectromechanical system) 기술을 이용한 마이크로바이오칩에 대한 연구는 생화학 실험에 있어서 시료 양과 실험 시간의 절감을 가져오게 하였다. 이로 인해 실험 대상이 되는 바이오 시료에 따른 마이크로바이오칩에 대한 연구가 활발히 진행 중이며, 그 중 생물학적 유전정보를 담고 있는 DNA(deoxyribonucleic acid)를 대상으로 한 마이크로바이오칩에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.⁽¹⁻¹²⁾ DNA를 적절히 조작하여 유전물질을 개조시키는 것이 목적인 유전공학에서는 원하는 대로 DNA를 조작하고 분석하는 일이 중요한 공정이다. 특히, 단백질과는 달리 세포 내에서 별도의 물체로 존재하지 않는 DNA는 특정 부위만 분리해 내는 일이 매우

중요하다. DNA를 기계적인 절단에 의해 작은 조각들로 절단시킬 수는 있지만, 십만 이상의 유전자로 구성되어 있는 포유동물 DNA를 수많은 부분 조각들로 절단하여 특정 유전자만을 포함하고 있는 미세한 부분 조각을 찾는 것은 매우 힘들다. 그리고 매우 큰 DNA 분자들이 수없이 많이 들어있는 게놈 샘플을 절단하는 과정에서, 각 분자들은 다르게 절단될 것이다. 이러한 문제점은 제한효소로 알려진 일단의 박테리아 효소들이 발견되면서 해결되기 시작하였다.⁽¹³⁾

제한효소는 DNA 상의 특정 염기 서열을 인지하여 절단하는 특성을 지녔다. 따라서 다양한 제한효소들을 이용하여 게놈으로부터 특정한 DNA 부분 조각을 만들어 낼 수 있다. 제한 효소를 이용하여 DNA의 특정 부위를 절단하는 방법은 산업·의료용으로써 매우 폭 넓게 사용되고 있다. 이러한 방법은 현재 실험자에 의해 수작업으로 행해지므로 많은 시간이 걸리고 불편한 점이 많다. 따라서 소량의 시료만으로 되도록 빠른 시간 내에 간단히 제한효소 반응을 조작할 수 있는 마이크로 칩이 연구되고 있다.^(1,11) Stephen 등은 상온에서 제한효소 반응 뿐만 아니라 반응물을

* 한양대학교 대학원 정밀기계공학과

† 책임저자, 회원, 한양대학교 기계공학과

E-mail : ahnym@hanyang.ac.kr

TEL : (031)400-5281 FAX : (031)406-5550

** 한양대학교 분자생명과학부

전기영동으로 분리 분석할 수 있는 마이크로바이오칩을 유리기판으로 만들어 발표하였다.⁽¹⁾

본 연구에서는 유리 보다 훨씬 간편하게 제작할 수 있는 PDMS(polydimethylsiloxane) 위주로 제한효소 반응뿐만 아니라 그 반응물의 전기영동(electrophoresis) 검출을 한 개의 칩 상에서 실행할 수 있는 마이크로바이오칩을 개발하고자 한다. 맴스 기술을 이용하여 제한효소 반응을 일으킬 수 있는 초소형 히터 반응조와 절단된 DNA의 분리 유무를 확인할 수 있는 모세관 전기영동(capillary electrophoresis, CE)용 초소형 채널이 조합된 DNA 마이크로바이오칩을 제작하였다. 제작된 마이크로바이오칩으로 DNA 제한효소 반응을 수행하였고 그 반응 결과물을 같은 칩 상에서 모세관 전기영동으로 분리 및 확인할 수 있었다.

2. 마이크로바이오칩 설계 및 제작

개발하고자 하는 마이크로바이오칩의 개략도는 Fig. 1과 같다. 먼저 위가 열린 반응조(reactor)에 피펫으로 DNA 시료와 제한효소를 미량 주입한다. 그리고 마이크로 히터에 의해 적정 온도 반응조를 가열한 상태에서 제한효소 반응을 진행시키게 된다. 제한효소 반응으로 절단된 DNA 절편들은 약간 어긋난 십자 형태의 마이크로 채널들에 연결되어 모세관 전기영동이 실행된다. 반응조에서 반응이 끝난 시료는 첫 단계로 반응조로부터 배출구 1(waste 1 reservoir)까지 두 채널 사이에 인가된 전위차에 의해 이동된다. 그 다음 단계에는 완충액 주입구(buffer reservoir)와 배출구 2 사이에 전위차를 걸어 채널 교차 부분에 존재하는 미량의 시료 만이 분리채널(separation channel)로 모세관 전기영동되게 한다. 일반 바이오칩용 CE 장치를 이용하여 주입구와 배출구들에 고전압을 인가하며 분리채널에서 분리된 DNA 절단 분자들을 측정하게 된다.

본 연구에서 제작된 바이오칩의 제작과정은 Fig. 2와 같다. 칩의 주재료로, 바이오 맴스 분야에서 생화학적 안전성이 검증된 PDMS와 유리를 사용하였다. DNA와 제한효소를 반응시키기 위한 반응조와 반응 산물을 전기영동하기 위한 마이크로 채널 들은 PDMS 칩으로 제작하였고, 금 박막형태의 마이크로 히터는 유리칩 위에 제작하였다. 최종적으로 PDMS 칩과 유리칩을 접합하여 바이오칩을 완성하였다.

PDMS 칩은 복사형틀법(replica molding)을 이용하여 제작하였다. 실리콘 웨이퍼에 음성후막감광

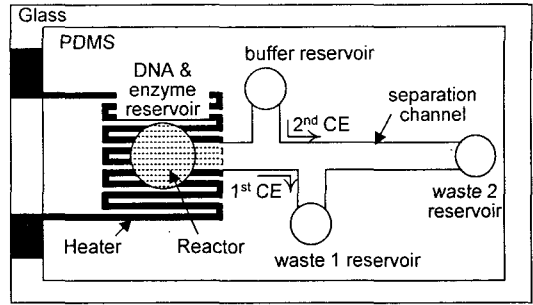


Fig. 1 Schematic of a microbiochip for DNA restriction enzyme reaction and its electrophoresis

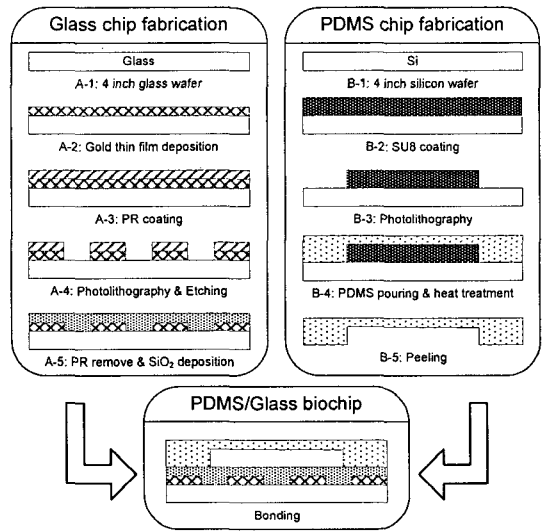


Fig. 2 Fabrication process of PDMS/glass microbiochip

제(negative photoresist, SU8)를 100 μm 두께로 스핀 코팅 한 후 열처리를 한다. 열처리가 끝난 후 사진공정(photolithography) 기법을 이용하여 반응조 모양 및 마이크로 채널 형상을 갖는 형틀(mold)을 제작한다. 제작된 형틀에 액체상태의 PDMS를 경화제와 10:1 비율로 섞어서 부어준다. 이를 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 동안 열처리를 하여 고체상태로 굳히며, 굳어진 PDMS를 형틀에서 벗겨낸 후 설계된 형상으로 잘라서 PDMS 칩을 완성한다. 금속배선 히터가 부착될 유리칩은 유리(pyrex7740, Corning) 웨이퍼에 열기상증착법(thermal evaporation)으로 크롬과 금 박막을 각각 200 \AA /1000 \AA 두께로 증착시킨다. 히터 설계형상을 사진공정 기법으로 패터닝을 한 후 시료와 히터와의 생화학적 절연을 위해 플라즈마 강화 화학기상증착법(PECVD)로 1 μm 두께의 산화막(SiO_2)을 증착한다.

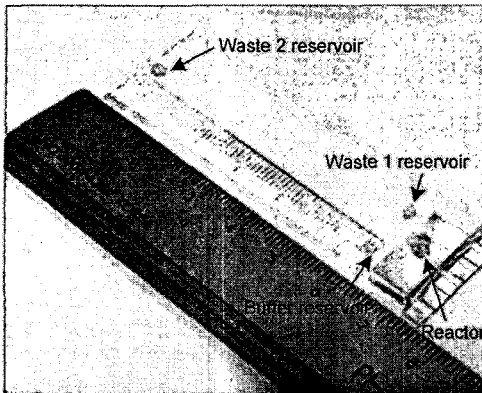


Fig. 3 Photograph of the fabricated microbiochip

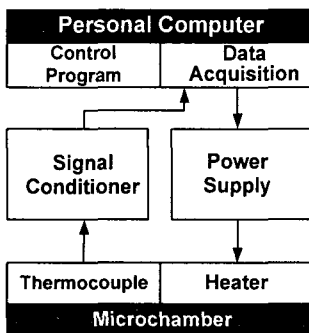


Fig. 4 Schematic of reactor temperature control system.

각기 제작된 칩은 산소 플라즈마(O_2 plasma) 표면처리를 통해 접합한다. 최종적으로 제작된 제한효소반응 및 전기영동 검출용 마이크로바이오 칩은 Fig. 3 과 같다. 제작된 히터의 저항값은 70~80 Ω 정도이며 전체 칩의 크기는 25mm × 75mm 이다.

3. 제한효소 반응 및 전기영동 실험

제한효소는 DNA 를 화학적으로 절단하는 일종의 생물학적 도구이다. 제한효소는 DNA 의 특별한 염기서열에 작용하며 긴 DNA 분자를 짧은 단편으로 자르는데 아주 유용하게 사용된다. 이러한 특징으로 인해 DNA 클로닝(cloning)에 있어서 필수적인 과정 중 하나이다. 제한효소로 자른 DNA 로, 대장균 등에서 염색체와 별도로 존재하는 큰 고리모양의 이중나선 DNA 인 플라스미드(plasmid)를 선택하였다. 플라스미드는 균의 증식에 있어서 필수적인 것은 아니지만 자기복제능을 가지고 있는 DNA 이다. DNA 클로닝은 이러한 자기복제 능력을 가진 플라스미드 DNA 를

사용하여 시험관 내에서 이중 DNA 를 플라스미드 내로 삽입한 후 그것을 수용균에 넣으면 플라스미드의 복제와 함께 이중 DNA 도 복제되어 유전되는 점을 이용한다. 이러한 이중 DNA 를 운반하는 플라스미드를 벡터(vector)라고 부른다.

본 연구에서는 pBR322 와 pGEM®-4Z (Promega)를 벡터로 사용하였다. 선택된 벡터의 절단부위 선택 및 그에 따른 제한효소의 선정은 제한효소 지도를 참고하였다. DNA 클로닝에서는 벡터에 삽입될 이중 DNA 의 부착말단(cohesive end) 염기서열과 제한효소에 의해 절단되어 생기는 벡터의 부착말단의 염기서열이 서로 상보적 이도록 제한효소를 선택하지만 본 논문에서는 앞서 말한 이중 DNA 에 대한 고려 없이 임의의 제한효소 두 가지를 선택하여 제한효소 반응 실험을 하였다. pBR322 벡터의 경우에는 Hind III 와 Sty I 를, pGEM®-4Z 벡터는 Hind III 와 Sca I 를 각각 제한효소로 사용하였다. pBR322(4361bp) 벡터는 Hind III 와 Sty I 로 제한효소 반응을 수행하면 1340bp, 3021bp 길이의 DNA 절편들로 잘리게 되고 pGEM®-4Z 벡터는 Hind III 와 Sca I 로 반응시키면 984bp, 1762bp 길이의 절편들로 잘린다.

마이크로바이오칩에서 제한효소 반응을 위해 사용된 시료의 양은 5 μ l이며 마이크로 히터에 인가된 소요전력은 0.78 Watt 였다. 제한효소 반응을 위한 온도제어 시스템은 Fig. 4 와 같다. 온도제어 시스템은 칩에 전원을 공급하는 전원 공급기(E3631A, Agilent Technology), 열전대 온도 센서(k-type thermocouple), 열전대에서 나오는 미약한 전압 신호를 증폭하는 신호 처리기(SCC-TC01, National Instrument), 컴퓨터에 연결된 데이터 수집 보드(PCI-6024E, National Instrument), 그리고 컴퓨터 제어기로 구성되어 있다. 제어 순서는 먼저, 열전대를 마이크로 반응조 내에 꽂아 넣는다. 전원 공급기를 통해 칩에 일정량의 전압을 히터에 공급한다. 신호 처리기를 통해 데이터 수집 보드에 연결된 열전대로 반응조 내부의 온도를 측정한다. 제어기는 측정된 온도를 제한효소 반응을 수행하기 위해 필요한 온도인 37 $^{\circ}$ C와 비교하여 전원을 점멸제어 해주게 된다. 점멸제어의 불감대(dead band)는 $\pm 0.5^{\circ}$ C 이다. 이렇게 제한효소 반응조의 온도를 37 $^{\circ}$ C로 유지해주는 제어를 위해 LabVIEW 7.0 (National Instrument) 소프트웨어를 이용하였다.

마이크로 반응조의 제한효소 반응 결과물을 바이오칩 내의 마이크로 채널로 연결하여 모세

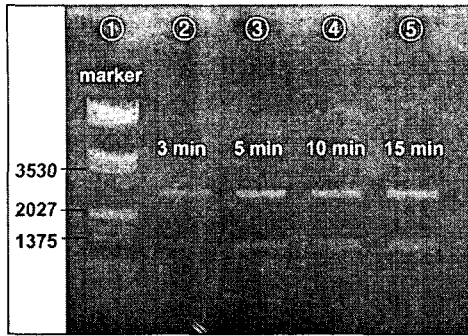


Fig. 5 Photograph of gel electrophoresis for products from the digestion of the plasmid pBR322 by the enzyme Hind III and Sty I with the variation of reaction time in the microbiochip. The numbers are the fragment lengths in base pairs

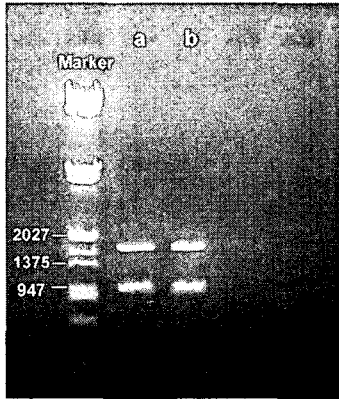


Fig. 6 Photograph of gel electrophoresis for products from the digestion of the plasmid pGEM[®]-4Z by the enzyme Hind III and Sca I using (a) conventional way and (b) the microbiochip. The numbers are the fragment lengths in base pairs

관 전기영동을 수행하게 되는데, 전기영동의 구동과 전기영동으로 분리된 DNA 절편들의 검출을 위하여 본 연구에서는 상용장치인 Digital Bio社의 DBMA-100 를 사용하였다.

4. 실험결과

4.1 제한효소 반응 실험결과

제작된 칩에서 제한효소 반응이 완료되는데 필요한 시간을 알아보기 위하여, 여러 반응 수행 시간에 대한 반응완료 여부확인 실험을 하였다. pBR322 백터를 제한효소 Hind III 와 Sty I 로 3, 5, 10, 15 분간 별로 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후

반응완료 여부를 확인하기 위해 일반 실험실에서 사용하는 전기영동 장치에 1% 아가로우즈 겔(agarose gel)을 이용하여 100V 에서 20 분간 전기영동을 수행하였고 Fig. 5 는 그 결과를 보여준다. Fig. 5 에서 ①번 열은 인덱스 마커(index marker)인 λ DNA/EcoR I+Hind III (Promega)을 전기영동 한 것이다. 3분에서 15분까지의 각 시간대 별 반응 결과물들은 ②번 열부터 ⑤번 열까지 순서대로 주입하여 전기영동을 하였다. pBR322 백터를 제한효소 Hind III 와 Sty I 를 이용하여 절단하면 1340bp, 3021bp 길이의 DNA 절편들로 잘리게 된다. 칩에서 반응시킨 결과물들의 전기영동 결과들을 인덱스 마커의 DNA 절편 띠(band)들과 비교하면, 예상되는 절편크기의 DNA 들로 분리된 것을 알 수가 있다. 각 시간대 별로 모두 제한효소 반응이 제대로 일어났지만 3 분간 반응을 실행한 결과의 전기영동 된 DNA 절편 띠의 색깔이 다른 반응시간대의 결과물들보다 약간 흐림을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 제작된 마이크로바이오칩의 경우 제한효소 반응을 5 분 이상 수행해야 안전하다.

pGEM[®]-4Z 백터와 제한효소 Hind III, Sca I 에 대해서, 기존방법의 제한효소 반응과 마이크로칩을 이용한 반응의 결과를 비교해 보았다. 기존 방법 실험에 따라 $\sim 25 \mu\text{l}$ 시료를 37 $^{\circ}\text{C}$ 일반 항온 수조에서 2 시간 동안 제한효소 반응을 수행하였다. 마이크로바이오칩을 이용한 실험에서는 10 분간 반응을 수행하였다. 반응 결과물들을 일반 전기영동 장치에서 0.8% 아가로우즈 겔을 이용하여 인가전압 50V 로 40 분간 전기영동 하였으며, 그 결과는 Fig. 6 와 같다. Fig. 6 의 첫 번째 열은 λ DNA/EcoR I+Hind III 인덱스 마커에 해당하며, a 열은 일반 항온 수조를 이용한 효소반응 실험결과이고 b 열은 마이크로바이오칩을 이용한 실험결과이다. Fig. 6 에서 알 수 있듯이, 마이크로바이오칩을 이용할 경우 훨씬 짧은 반응시간과 적은 시료의 양으로도 기존의 실험방법과 동일한 결과를 낼 수 있음을 확인할 수 있었다.

4.2 모세관 전기영동 실험결과

PDMS 는 소수성을 가지므로 모세관 현상이 일어나기 힘들다. 유리칩과 PDMS 칩 접합을 위해 행해지는 산소 플라즈마 칩표면 처리는 소수성 PDMS 를 친수성으로 변환시키지만, 시간이 경과됨에 따라 다시 소수성으로 돌아가게 된다. 산소 플라즈마 처리로 PDMS 가 친수성으로 된 상태에서 모세관 현상이 가장 잘 일어날 수 있

는 마이크로바이오칩 채널의 높이와 폭을 찾기 위한 실험을 행하였다. 채널 높이는 60, 100 μm 로 채널 폭은 35, 50, 65, 80, 95 μm 로 변화시키면서 각각의 채널 내에서의 1×TAE 완충액의 모세관 현상에 의한 유체 이동속도를 측정하였으며 그 결과는 Table 1 과 같다. 측정결과, 채널 폭이 80 μm , 채널 높이가 100 μm 일 때, 비교적 가장 빨리 모세관 현상으로 빈 채널이 용액으로 채워지는 것을 알 수 있었다. 하지만 산소 플라즈마 처리로 칩을 접합한 후 8 시간이상 경과되면 마이크로채널에서는 더 이상 모세관 현상에 의한 액체 이동이 발생하지 않았다.

본 실험에 사용된 모세관 전기영동 장치에는 4 개의 고전압 전극이 있으며, 레이저유도 형광 검출법으로 시료를 측정한다. 시료 측정에 사용된 레이저는 532nm, 10mW 녹색광이며, 빛전자증배관 광학검출기로 형광신호를 획득하였다. 제작된 마이크로바이오칩으로 전기영동을 수행할 때 채널 끝 단들에 인가한 전압들은 Table 2 와 같다. Table 2 와는 다른 전압들을 인가할 때에는 마이크로채널 내에서 시료가 타버리거나 기포가 생겨서 측정이 불가능하였다. 전기영동 실험에는 선행 실험에서 모세관 현상이 가장 양호했던 채널 폭은 80 μm , 채널 높이는 100 μm 로 제작된 칩을 사용하였다.

제작된 마이크로바이오 칩 상에서 먼저 λ DNA/EcoR I+Hind III 마커를 모세관 전기영동으로 분리하여 형광검출해 보았다. 그 결과 마커의 인덱스 DNA 띠들이 예상되는 절편들의 분자량별로 분리 검출됨을 확인할 수 있었다. 다음에는 플라스미드 pGEM®-4Z 를 제한효소 Hind III, Sca I 와 함께 마이크로바이오칩의 반응조에서 반응을 시킨 후 연속적으로 같은 칩의 마이크로채널에서 모세관 전기영동을 수행하여 형광검출하였다. Fig. 7 는 전기영동으로 분리된 DNA 절편들을 마이크로바이오칩 분리채널의 형광검출 부위에서 측정한 결과들이다. Fig.7 에서 마커의 인덱스 절편 크기들과 비교해 보면, 플라스미드의 제한효소 반응물이 예상되는 984bp, 1762bp 크기의 절편들로 분리 검출되고 있다. 따라서 마이크로바이오칩에서 제한효소 반응뿐만 아니라 그 결과물의 전기영동 분리 검출도 정상적으로 이루어짐을 보여주고 있다.

5. 결론

기존의 유리기반의 칩보다 재료비가 저렴하고 제작방법도 간단한 PDMS 기반의 DNA 용 바이

오칩을 개발하였다. 반응조와 채널이 있는 마이크로 PDMS 칩은 공정이 간단한 복사형틀법으로 제작하고, 생화학 반응에 필요한 열 에너지를 공급할 수 있는 마이크로히터가 있는 유리칩은 금속박막 패터닝으로 제작하였다. 최종적으로 이 두 칩을 결합하여 DNA 제한효소 반응을 수행하고 그 결과물을 모세관 전기영동으로 검출할 수 있는 마이크로바이오칩을 제작하였다. 제작된 칩을 통해 기존 생화학 실험실에서 90 분 가량 소요되던 제한효소 반응실험을 10 분 이내로 단축할 수 있었으며 검출에 걸리던 시간도 기존의 방법보다 줄일 수 있었다. 하지만 PDMS 자체의

Table 1 Measured flow velocity (in $\mu\text{m/s}$) of buffer in PDMS channel

Channel height	Channel width				
	35 μm	50 μm	65 μm	80 μm	95 μm
60 μm	3.9	4.8	6.2	8.0	7.6
100 μm	5.6	7.2	8.9	10.2	7.9

Table 2 Applied voltages in capillary electrophoresis with the microbiochip

Digestion product	DNA & enzyme reservoir	Waste 1 reservoir	Buffer reservoir	Waste 2 reservoir
Injecting	0 V	480 V	240 V	240 V
Separating	250 V	250 V	0 V	1.5 kV

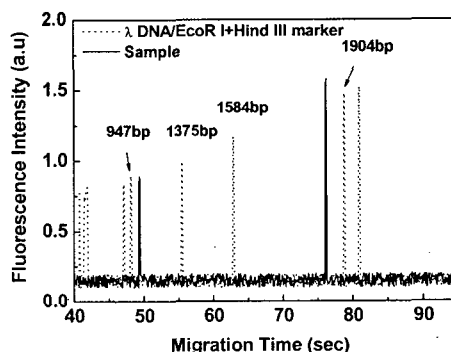


Fig. 7 Electropherogram of CE with the microbiochip. Sample is the products from the digestion of the plasmid pGEM®-4Z by the enzyme Hind III and Sca I

소수성 성질 때문에 마이크로바이오칩이 완성된 후 8 시간 이상이 지나면 모세관 현상이 사라져 전기영동 실행에 문제가 있음이 밝혀졌다. 이 문제는 친 생화학적이면서 PDMS 채널내부를 반영구적으로 친수성 성질로 바꿀 수 있는 표면처리 방법에 대한 연구를 통해 해결될 수 있으리라 여겨지며 지금 이에 대한 연구가 수행 중에 있다.

참고문헌

- (1) Stephen, C., Jacobson, J. and Ramsey, M., 1996, "Integrated Microdevice for DNA Restriction Fragment Analysis," *Anal. Chem.*, Vol. 68, pp.720~723.
- (2) Burns, M. A., Johnson, B. N., Brahmamandra, S. N., Handique, K., Webster, J. R., Krishnan, M., Sammarco, T. S., Man, P. M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, and Burke, D. T., 1998, "An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device," *Science*, Vol. 282, pp. 484~487.
- (3) Zhan, Z., Dafu, C., Zhongyao, Y. and Li, W., 2000, "Biochip for PCR Amplification in Silicon," *1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, Lyon, France, pp. 25~28.
- (4) Schabmueller, C. G. J., Evans, A. G. R., Brunnschweiler, A., Ensell, G., Leslie, D. L. and Lee, M. A., 2000, "Design, Fabrication and Packaging of Closed Chamber PCR-Chips for DNA Amplification," *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*, Vol. 4019, pp. 362~369.
- (5) Hong, J. W., Fujii, T., Seki, M., Yamamoto, T. and Endo, I., 2001, "Integration of Gene Amplification and Capillary Gel Electrophoresis on a Polydimethylsiloxane-Glass Hybrid Microchip," *Electrophoresis*, Vol. 22, pp. 328~333.
- (6) Schneegaß, I., Bräutigam, R., and Köhler, J. M., 2001, "Miniaturized Flow-Through PCR with Different Template Types in a Silicon Chip Thermocycler," *Lab on a Chip*, Vol. 1, pp. 42~49.
- (7) Fujii, T., 2002, "PDMS-Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications," *Microelectron. Eng.*, Vol. 61-62, pp. 907~914.
- (8) Yoon, D. S., Lee, Y.-S., Lee, Y., Cho, H. J., Sung, S. W., Oh, K. W., Cha, J. and Lim, G., 2002, "Precise Temperature Control and Rapid Thermal Cycling in a Micromachined DNA Polymerase Chain Reaction Chip," *J. Micromech. Microeng.*, Vol. 12, pp.813~823.
- (9) Shin, Y. S., Cho, K., Lim, S. H., Chung, S., Park, S.-J., Chung, C., Han, D.-C. and Chang, J. K., 2003, "PDMS-Based Micro PCR Chip with Parylene Coating," *J. Micromech. Microeng.* Vol. 13, pp. 768~774.
- (10) Liu, R. H., Yang, J., Lenigk, R., Bonanno, J., and Grodzinski, P., 2004, "Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection," *Anal. Chem.*, Vol. 76, pp. 1824~1831.
- (11) Jin, S.-H., Cho, Y.-J. and Ahn, Y., 2004, "Study on PDMS/Glass Microthermostat Fabrication and Evaluation for Restriction Enzyme Reaction," *Trans. of the KSME (A)*, Vol. 28, No. 10, pp. 1598~1602.
- (12) Cho, C.-H., Cho, W., Ahn, Y., Huh, Y.-S., Yeom, H.-J., and Hwang, S.-Y., "PDMS/Glass Microbiochip for Biochemical Reaction Application," *Proceedings of the KSME 2005 Spring Annual Meeting*, pp. 1740~1744.
- (13) Campbell, N. A, Reece, J. B., and Simon, E. J., 2004, *Essential Biology*, 2nd ed., Benjamin Cummings, San Francisco, pp. 220~223.