

나노바이오기술을 이용한 환경모니터링용 바이오칩 시스템

김 영 기 · ¹민 준 홍 · ²오 병 근 · † ²최 정 우
한경대학교 화학공학과, ¹경원대학교 바이오테크놀로지학과, ²서강대학교 화공·생명공학과
(접수 : 2007. 10. 31., 게재승인 : 2007. 12. 14.)

Biochip System for Environmental Monitoring using Nanobio Technology

Young-Kee Kim, Junhong Min¹, Byung-Keun Oh², and Jeong-Woo Choi^{2†}

Department of Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong-Si, Gyeonggi-Do 456-749, Korea

¹Department of Bionano Technology, Kyungwon University, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do 461-701, Korea

²Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea

(Received : 2007. 10. 31., Accepted : 2007. 12. 14.)

Bio-sensing devices, which are basically integrated and miniaturized assay systems consisted of bioreceptor and signal transducer, are advantageous in several ways. In addition to their high sensitivity, selectivity, simplicity, multi-detection capability, and real time detection abilities, they are both very small and require relatively inexpensive equipments. Two core technologies are required to develop bio-sensing devices; the fabrication of biological receptor module (both of receptor development and immobilisation of them) and the development of signal transducing instruments containing signal generation technique. Various biological receptors, such as enzymes, DNA/RNA, protein, and cell were tried to develop bio-sensing devices. And, the signal transducing instruments have also been extensively studied, especially with regard to electrochemical, optical, and mass sensitive transducers. This article addresses bio-sensing devices that have been developed in the past few years, and also discusses possible future major trends in these devices.

Key Words : Biosensor, biochip, environmental monitoring

서 론

최근 십여년간 생명공학분야는 눈부신 발전을 이루어왔으며, 현재도 매우 활발한 연구개발이 진행되고 있다. 이러한 생명공학의 중요 분야 중 하나로 바이오센싱 분야가 있으며 활발한 연구개발이 이루어지고 있다. 바이오센서는 크게 생체인식소재와 신호전달장치로 구성되어 있으며 두가지 분야에서 활발한 연구개발이 이루어져왔다. 생체인식 소재에서는 바이오센서 연구개발 도입기부터 꾸준히 연구되고 있는 효소를 이용한 효소센서가 있으며 혈당센서로 상용화되어 바이오센싱 장치 중 가장 큰 성공을 이루었다. 연구개발 초창기부터 생체인식소재로 사용되던 또 하나의 생체소재로는 세포가 있으며 초기에는 BOD 센서

등의 개발을 위해 제한적으로 사용되던 것이 최근에는 세포칩의 개념으로 확대되어 신약개발을 위한 스크리닝, 환경오염물질의 모니터링 등에 대한 용도로 활발히 연구되고 있다. 이 외에 항원-항체 반응을 이용하는 면역기반 기술도 비교적 간단한 형태의 면역센서로부터 array 기술이 도입된 단백질칩 기술까지 다양한 응용이 되고 있다. DNA, RNA 등 핵산을 이용한 바이오칩 분야도 초기에 임상진단용 응용으로 제한되던 것이 근래에는 환경모니터링 용도로 활발한 연구개발이 진행되고 있으며, aptamer, peptides 등 인공 생체소재를 이용한 바이오센싱시스템의 개발도 활발한 연구가 이루어지고 있다. 바이오센서 또는 바이오칩으로 칭할 수 있는 바이오센싱 디바이스 분야의 연구가 폭발적으로 수행되고 이에 따라 기술적 혁신이 일어나고 있는 시기라고 할 수 있겠다. 신호전달기법에서도 전기화학적, 전기적, 광학적, mass sensitive 방법 등 다양한 기법에 대한 광범위한 연구개발성과들이 쏟아져 나오고 있다. 따라서 본고에서는 다양한 바이오센싱 디바이스 연구개발분야 중에 생체소재에 초점을 맞춰 효소, 핵산, 단백질 (항체 등), 세포 기반의 바이오센싱 디바이스에 대한

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea

Tel : +82-2-705-8480, Fax : +82-2-714-3560

E-mail : jwchoi@sogang.ac.kr

최신의 연구결과를 소개하고자 한다.

효소 센서

효소반응을 이용한 바이오센서는 사용상의 편의성, 전문적 분석장치의 사용이 필요 없고 다양한 성분을 동시측정할 수 있는 등 장점을 가지고 있어 활발한 연구가 이루어져 왔다. 효소를 이용한 촉매반응은 일반적으로는 수용액 상태에서 이루어져 왔지만, 바이오센서분야의 연구자들은 이러한 용액상에서의 효소반응을 유기물 담체에서 수행할 수 있게 함으로써 센서로의 응용을 가능하게 하였다. 이를 위해서는 담체 위에 고정화된 효소의 활성이 유지되게 하는 기술개발이 수행되었다(1, 2). 효소를 고정화하는데 유기용매를 사용하는 기술이 적용됨으로써 친수성 이온종에 의한 저해작용을 줄일 수 있었고 미생물에 의한 오염이 제거되어 센서의 수명을 연장시킬 수 있었다. 이러한 유기용매 상에서의 고정화기법은 흡착기법, 유기 또는 무기 matrix 내의 포괄법 등 수많은 발전이 이루어졌다(3, 4). 효소센서의 핵심부분은 측정대상과의 특이적 반응성을 가지는 효소이며, 이 효소 단백질이 유기담체에 고정화되어 활성을 유지하게 하고 고정화된 효소의 반응성에 의해 측정이 가능하게 된다.

이러한 효소 센서는 신호전달방법에 의해 전기화학적 센서, 광학적 센서로 크게 구분할 수 있으며, 전기화학적 센서는 효소센서분야의 초기부터 널리 사용되어진 방법으로 현재까지 전세계적으로 바이오센서시장의 대부분을 차지하고 있는 혈당센서에 응용되어져 상업적으로 커다란 성공을 거두었다. 그러나 초창기 전기화학적 센서는 noise에 의해 고민감도의 구현이 어려웠으며 전기적 측정분석 기술의 한계를 가지고 있었다. 따라서 이를 극복하기 위하여, 흡광, 형광, 발광 등 다양한 광학적 측정기술이 개발되어 졌으며 이 광학적 측정기술은 후에 DNA chip, protein chip 등에 응용되었다.

전기화학적 효소센서

전기화학적 효소센서로는 tyrosinase, catalase, peroxidase, oxidase, esterase 등 다양한 효소들이 적용되었다(5). Tyrosinase (polyphenoloxidase, PPO)는 Cu를 포함하는 효소로 melanin 색소 등을 생성하는 반응을 촉매하는 자연계에 매우 광범위하게 분포하는 효소이다. Sánchez-Ferrer 등은 이 효소를 이용하여 monophenol을 o-diphenol로 반응시키고, 이어서 o-quinone으로 산화시킴으로써 유도되는 전기화학적 변화를 측정하는 효소센서를 개발하였다(6). Consnier 등은 유리탄소전극에 고정화된 amphiphilic pyrrole lactobionamide-효소 혼합물의 전기화학적 중합반응을 이용하여 클로로포름에 존재하는 catechol을 측정할 수 있는 효소센서를 개발하였다(7). Catalase를 이용한 효소센서로는 최근에 유기용매 상에 존재하는 과산화수소를 측정할 수 있는 flow injection analysis system과 결합된 효소센서가 발표되었다(8). Polyacrylamide gel에 entrap된 catalase는 백금 조성의 working electrode 표면에 부착되고, Ag-wire를 포함

한 Teflon 홀더에 고정되었다. 이 센서는 수용액 및 유기용매 상의 과산화수소 측정에 적용되어 넓은 농도범위에서 과산화수소 측정이 가능함을 보였다. Peroxidase를 이용한 효소 센서에는 horseradish peroxidase (HRP)가 가장 널리 사용되어져왔다. Peroxidase는 ascobate, ferrocyanide, cytochrome C 등 다양한 기질의 산화에 관여한다. Mulchandani 등은 HRP를 기반으로 하는 효소센서를 개발하여 수용액 및 유기용매 상의 peroxide를 측정하는데 이용하였다(9). Acetylcholinesterase (AChE)는 환경오염물질의 측정을 위한 효소센서로 가장 많이 사용된 효소중 하나이다. Andreescu 등은 styrylpyridium group을 이용하여 AChE를 polyvinyl alcohol에 고정화시킨 screen printed 효소센서를 개발하여 p-aminophenyl acetate의 전기적 산화를 측정함으로써 p-aminophenyl acetate 모니터링이 가능하게 하였다(10).

광학적 효소센서

전기화학적 효소센서가 가지는 민감도의 한계 및 신호 전달장치의 noise 발생문제 등에 대한 대안으로 광학적 효소센서에 대한 연구가 활발히 이루어져왔다. 유기인화합물은 살충제 성분으로 광범위하게 사용되어져 왔었고, 근래에는 신경독성 생화학무기로도 사용되어지고 있어 신속하고, 정확한 측정에 대한 요구가 매우 큰 분석대상이다. 유기인화합물을 분석하기 위한 효소센서는 여러 연구자들에 의해 개발되어져왔다(11-13). 대부분의 유기인화합물 측정용 효소센서는 AChE에 대한 유기인화합물의 저해작용을 이용한 측정기작을 가지고 있다. 광섬유를 이용한 광학센서는 다른 센서형태에 비해 원격측정, 다성분 측정, 전기적 방해의 제거, 소형화가 가능한 다양한 장점들을 가지고 있다. 따라서 많은 연구자들이 유기인화합물 측정을 위한 AChE 효소센서를 개발하였는데, 이들은 충전층 효소반응기나 튜브형 효소반응기를 이용한 것으로서 기질의 물질 전달 제한, 효소배열의 불규칙성 등의 단점을 가지고 있었다(14, 15). 따라서 본연구진은 Langmuir-Blodgett (LB) 고정화기법을 이용하여 AChE를 방향성을 가지게 고정화시킴으로써 측정민감도를 높인 효소센서를 개발하였다(16). 하지만 이 센서는 산성을 가지는 효소반응생성물을 pH sensitive 염료를 이용하여 흡광도를 측정하는 방법을 사용한 것으로서 간접적 측정방법으로서의 한계를 가지고 있었다. 또한 pH 변화에 의한 효소의 불활성화라는 문제를 필연적으로 가지게 되었다. 따라서 본연구진은 pH에 의존하지 않는 측정기법으로써 o-nitrophenyl acetate를 기질로 사용하고 o-nitrophenol을 효소생성물로 얻는 효소반응을 이용하여 노란색을 띠는 o-nitrophenol의 광학적 특성을 흡광도 측정법으로 직접 분석하는 효소센서 시스템을 개발하였다(17).

또한 본연구진은 식물재배를 위한 살균제로 널리 사용되는 captan을 측정하기 위한 효소센서를 개발하였는데, 고정화된 효소를 이용하여 색을 가지는 효소반응 생성물을 흡광도분석법으로 정량적으로 분석하는 기법을 이용하였다. 사용된 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)과 glutathione (GSH)은 glutathione-s-transferase (GST) 효소에 의해 노란색을 띠는 s-(2,4-dinitrophenyl)glutathione 생성물로

변환된다. 이 효소반응은 captan에 의해 저해되며 생성물의 양을 흡광도를 이용하여 분석함으로써 저해정도를 정량적으로 표현하였다(18). 개발된 효소센서는 2 ppm까지의 captan 농도를 15분 이내에 측정할 수 있는 성능을 보였다. 본 연구진은 개발된 유기인화합물 측정용 효소센서와 captan 측정용 효소센서를 결합하여 동시 이성분 측정이 가능함을 보였다. 이 연구에서는 유기인화합물의 일종은 paraoxon과 captan을 동시에 측정하는 것이 가능하다는 것을 증명하였으며 측정한계농도는 각각에 대해 2 ppm 수준이었다(19).

DNA/RNA 칩

바이오센서의 한 축을 이루고 있는 환경용 바이오센서는 환경 독성 박테리아 및 바이러스를 측정하는 바이오센서가 주축을 이루고 있다. 환경 독성 박테리아 측정의 대표적인 예는 대장균 측정이다. 대장균은 대표적인 오염물질로서, 배설물 오염의 표준지표로 여겨진다. 대장균을 포함한 박테리아를 측정하는 기존의 대표적인 방법 (Final Coliform Rule)은 네종류가 있다(20-23). Presense-Absence법, Most-Probable-Number법, MMO-MUG (minimal medium o-nitrophenyl- β -galactosidase-4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide)법, Membrane filter (MF)법이 그것이다. 이러한 방법들은 세포를 배양하고 선택배지를 사용하며, 여러 방법을 통하여 측정을 하기 때문에 정확하기는 하나, 측정 시간이 오래 걸리고, 형태학적인 방법에 의존한 동정방법에 의해 결과 해석이 어렵다는 단점을 가지고 있다(24). 그러므로 높은 특이성 및 선택성 등 많은 장점을 가지고 있는 핵산을 이용하는 기술이 최근에 다양하게 연구되고 있다(25). 핵산을 이용하기 위해서는 일반적으로 세포파괴 및 핵산 추출과정, 핵산 정제과정, 핵산 증폭과정, 핵산측정과정을 수행해야 한다(Fig. 1). 그러므로 본고에서는 환경모니터링용으로 사용되는 핵산이용 바이오센서 및 칩을 공정 기술 중심으로 설명하고자 한다.



Figure 1. Schematic diagram of nucleic acid bio-sensing system to detect bacteria and virus.

핵산 정제 기술

핵산이용 박테리아 측정에서 시료 증폭에 의해 신호의 증가를 이루기 위한 필수 공정에 필요한 핵산증폭 기술을 이용하여 환경 독성 박테리아를 측정하기 위해서는 박테리아, 바이러스의 세포파괴 및 핵산추출 공정이 필요하다. 핵산 추출 방법은 기존의 chloroform을 이용한 액상 방법에서 Boom에 의해 고상 추출 기술이 개발되면서 손쉽게 DNA 및 RNA를 추출, 정제할 수 있게 되었다(26). Boom 기술은 세포를 파괴하고, 추출된 핵산을 정제하기 위하여 카오트롭픽 염 (chaotropic salt)에 의해 표면부근의 물분자가 제거되고 실리카 표면과 핵산이 수소결합을 할 수 있게 되어 실리카 표면에 핵산이 흡착하고, 알코올을 이용하

여 흡착된 핵산을 정제하는 기술이다. 하지만, 핵산을 이용한 박테리아 측정방법이 센서에서 LOC (Lab-on-a-chip)으로 진화하면서, Boom 기술은 여러 문제를 발생하게 되었다. 카오트롭픽 염과 알코올은 다음공정인 PCR 반응의 저해물질로 알려져 있기 때문에 장시간의 세척시간이 필요하기 때문이다. 그러므로 LOC 기반의 핵산 정제 및 증폭 장치는 장시간을 요구되게 된다(27). 이 단점을 극복하기 위하여 많은 연구, 개발이 이루어졌으며, 대표적으로 CST (Charge Switch Technology) 기술, SPRI (Solid-Phase Reversible Immobilization Technology) 기술이 있다(28, 29). 이 기술들은 표면을 개질하거나, PEG (PolyEthylene Glycol)와 같은 다른 화학물질을 첨가하여 카오트롭픽 염을 사용하지 않는 것을 특징으로 한다. CST 기술은 pH에 의해 표면의 성격이 변화할 수 있도록 표면에 유기막을 코팅하고, 용액의 pH를 변화시켜 핵산을 흡, 탈착시키는 기술로써, 유기물질은 아민 그룹이나, 카르복실 그룹같이 용액의 pH에 의해 pKa 값이 변화되는 물질을 사용한다. 현재 많은 회사들에 의해 상품화가 이루어져 있으며, Boom 기술과 함께 대표적인 핵산 추출 및 정제 기술로 사용되고 있다. SPRI 기술은 상대적으로 높은 농도의 염화나트륨과 같은 일반적인 염과 PEG를 이용하여 카르복실기가 풍부한 표면에 핵산을 흡착하는 원리를 이용하는 것으로써, 핵산증폭 반응의 저해물질을 사용하지 않는다는 장점이 있다(30). 상기에 언급한 핵산추출 및 정제 기술은 필터 또는 마이크로 입자를 포함한 튜브형식으로 상업적으로 판매되고 있다.

핵산증폭기술

핵산을 이용하는 기술이 광범위하게 이용되는 가장 큰 이유는 핵산 증폭 기술의 발달이다. PCR (Polymerase Chain Reaction)은 핵산 증폭의 대표적인 기술로써, 높은 핵산을 이용한 박테리아 및 바이러스 측정에 높은 특이성과 선택성을 제공한다. 이러한 핵산 증폭 방법은 PCR 뿐만 아니라, RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), RCA (Rolling Circle amplification), NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), SDA (Strand Displacement Amplification), TMA (Transcription Mediated Amplification), LCR (Ligase Chain Reaction) 등이 있다(31-34). 그중에서 RCA 기술은 이론적으로 현존하는 기술 중 가장 sensitive한 기술로써, 하나의 프라이머를 ligation 반응을 통하거나 직접 circle 형태로 제작하여 반복되는 시퀀스를 가진 생성물로 증폭하는 기술로, 현재 단백질 측정을 포함한 다양한 분야에 응용되고 있다. 이 중에서 RNA를 증폭할 수 있는 기술은, RT-PCR, NASBA, TMA 등이며, 이중에서 NASBA와 TMA는 항온 반응에 의한 핵산증폭, 증폭 생성물이 RNA라는 것 등 기술 특성이 매우 유사하다. 환경 독성 박테리아를 측정하기 위하여 RNA를 증폭하는 것이 중요한 이유는 RNA 자체가 가지고 있는 불안정성에 있다. RNA는 일반적인 환경에서 수분 안에 분해되기 때문에, RNA를 측정하게 되면, 보통 기능을 유지하고 있는 박테리아만을 측정할 수 있게 된다. 그러므로 식품이나, 음용수 등 살균과정을 거친 후, 박테리아 검사

를 수행할 때, DNA가 아닌 RNA를 측정하는 것이 살균과정을 통해 파괴된 박테리아가 아닌 살아있는 박테리아를 측정하는 방법으로 유용하다.

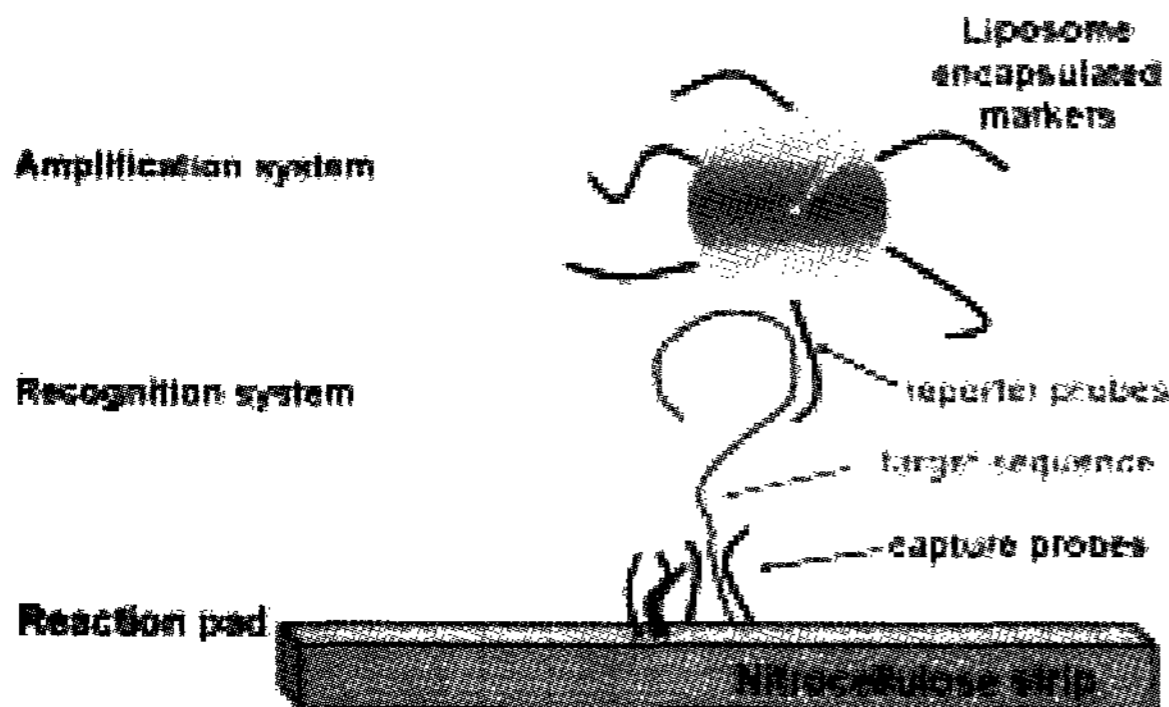


Figure 2. Principles of strip biosensor using liposome.



Figure 3. Microfluidic colorimetric biosensor using liposome ((a) negative control, (b) positive control).

핵산 측정기술

핵산을 측정하는 기술은 대부분 핵산 증폭 과정을 거친 생성물을 측정한다. 핵산을 측정하는 기술은 크게 측정 방식에 따라 광학적 측정방법, 기계적 측정방법, 전기화학적 측정방법, 전기적 측정방법으로 나눌 수 있다.

광학적 측정방법은 대표적인 바이오센서 및 바이오칩 신호방식으로써, 다시 발색단을 이용한 측정방법과 발광 측정방법, 그리고 SPR과 같이 표면 측정 방법으로 크게 나눌 수 있다. 발색신호를 이용하는 방법은 스트립센서와 같은 멤브레인을 이용하는 일회용센서에 자주 이용된다. 대부분 직접 관찰을 하거나, reflectivity를 측정하는 방식으로 다량의 발색원이 필요하다. 이 경우는 Fig. 2와 같이 리포솜과 같이 다량의 발색단을 포함할 수 있는 표지물질을 이용하거나, 나노입자와 같이 입자 반응 및 흡착에 의한 발색신호 발생이 가능한 방법, 효소를 표지자로 하여 효소 반응의 생성물을 이용하는 방법을 이용한다(35-37). 리포솜은 보통 발색물질을 10⁵개 정도를 포함할 수 있으며, DNA 결합 반응 후, 이온량의 변화 및 계면활성제의 투여로 리포솜을 붕괴시켜 리포솜에 포함된 발색물질을 방출시켜 발색신호를 증가시키는 방법을 이용한다(Fig. 3)(38). 나노입자를 이용하는 방법은 나노입자가 접합 (aggregation)될 때 그 색깔이 변화한다는 특성을 이용한다. Mirkin은 금나노입자에 프로브를 고정화시키고, DNA 샘플이 있을 때, DNA-DNA 결합 반응에 의해 금 나노입자가 뭉쳐지게 되면, 나노입자 용액의 색이 변화하는 것과 온도를 조절함으로써, 단일핵산변이도 측정이 가능함을 보였다.

발광신호를 이용하는 방법은 DNA를 측정하는 방법의 대표적인 방법으로 다양한 방법이 개발되어왔다. Real time PCR에 의해 증폭된 생성물을 실시간으로 측정하여 박테리아 및 바이러스 진단할 때, 사용되는 방법은 크게 두가지 방법을 이용한다. Ethidium Bromide (EtBr), SYBR greenTM와 같은 이중 DNA 사이에 삽입되어 형광을 발생시키는 방법 또는 Taqman probe라고 불리는 방법을 이용한다 (39, 40). Taqman probe는 샘플과 상보적인 시퀀스를 가지고 있으며, 한쪽 끝에는 형광 물질 (Reporter), 반대쪽 끝에는 흡광물질 (quencher)을 가지고 있어, 샘플과 결합할 수 있게 되고, 다음 Taq DNA polymerase가 가지고 있는 5'-3'exonuclease activity에 의해 증폭 반응시 분해되면서 형광물질이 흡광물질과의 거리가 멀어지면서 형광을 발하게 되는 원리를 가지고 있어, 실시간 관찰이 가능하다.

DNA chip을 이용하여 PCR 생성물을 측정을 할 경우에는 대표적으로 기판에 고정화된 capture probe와 형광물질을 가지고 있는 reporter probe를 사용하는 샌드위치 타입의 측정 방식을 많이 사용하는데, 다른 방법으로는 dNTP 중 하나에 형광물질을 결합하여, PCR 생성물 자체가 수개 이상의 형광물질을 보유하게 만드는 방법을 이용하여, 측정 시간을 감소시키고, 형광신호를 증가시킨다(41).

SPR은 감쇠전반사 (Attenuated Total Reflection)를 응용한 광학적 바이오센서로써, 표면의 조건 변화에 따라 기판 경계면 근처의 물질과 상호작용을 하면서 생기는 에너지 이동 및 변화를 반사도의 변화로 표면에서 일어나는 생물반응을 측정할 수 있다. 이러한 비표지 방식이지만, pM 수준의 생물반응을 측정할 수 있는 SPR 시스템은 DNA 측정 뿐만 아니라, 신약개발에 필요한 저분자 측정 및 저농도 단백질 측정 등 다양한 분야에 응용될 수 있으며, 특이적 생물반응 및 비특이적 흡착 현상의 속도론을 연구할 때 매우 유용한 기술이다(42).

전기화학적 DNA 검출 방법은 DNA와 반응하는 전기화학적 지시물질을 이용하거나, DNA가 가지고 있는 guanidine의 전기화학적 특성을 측정한다. 전기화학적 지시물질은 DNA의 혼성화 반응을 인지해야하기 때문에 보통 DNA 이중가닥의 minor groove에 선택적 결합을 하는 물질을 이용한다. 대표적인 전기화학적 지시물질로는 tris (1,10-phenanthroline)cobalt complex [Co(phen)3³⁺]와 tris (2,2-bipyridine)cobalt complex [Co(bpy)3³⁺], Hoechst 33258, ferrocene complex 등이 있다(43). 또한 전기화학적 지시물질을 사용하지 않는 무표지 전기화학 DNA 측정 기술이 있다. DNA가 가지고 있는 guanine의 산화-환원 반응을 직접 측정함으로써, DNA의 존재유무를 측정할 수 있었다 (44). Guanine은 square wave voltammetry (SWV)에 의해 측정할 때, +0.73 V의 산화 피크를 가지고 있으므로 DNA가 혼성화된 후 DNA의 Guanine의 양을 산화반응을 통해 측정할 수 있었다.

핵산의 전기적 측정기술로는 대표적으로 CNT를 이용하는 기술과 nanowire를 이용하는 기술, 나노 갭을 이용하는 방법, 나노포어를 이용하는 방법 등이 있다(45-47). 전기적 바이오센서는 보통 표지물질을 사용할 때, 필요한 표식공정의 어려움 및 시간 및 비용의 단점을 극복하기 위해 개

발된 것으로서 무표지 측정 기술이 주를 이룬다. CNT를 이용하거나, nanowire를 이용하여 핵산을 측정하는 시스템은 CMOS 트랜지스터를 이용하여 DNA를 측정하는 것과 같은 기본 개념을 이용하나, 환경에서 발생하는 잡음을 제거할 수 있어 극저농도의 핵산 측정이 가능하다. 일반적인 트랜지스터 구조에 나노 사이즈의 갭을 제작하고 그 내부에 핵산 등이 존재할 때 갭의 유전율 변화를 측정하는 원리를 이용한 새로운 바이오센서가 연구되었다(48). 이런 나노갭을 이용하는 경우는 측정하고자 하는 물질의 크기와 비슷한 크기의 센서를 이용하기 때문에 민감도가 아주 높은 것을 특징으로 하고 있다. 이처럼 민감도를 높이기 위해서는 나노 수준의 시스템이 필요한데 그 대표적인 바이오센서는 나노포어이다. 나노포어는 핵산의 시퀀스를 측정하기 위해서 개발된 기술로써 coulter counter의 원리를 이용하지만 샘플 이동 원리가 coulter counter의 경우는 유속의 압력차이지만 나노포어의 경우는 핵산의 음전하를 이용한 전기장을 샘플이동의 힘으로 사용한다. 나노포어는 α -Hemolysin이라는 단백질을 포함시킨 멤브레인을 제작하고 한쪽면에서 반대쪽으로 핵산이 나노포어를 이동할 때 발생하는 포어의 막힘에 의하여 발생하는 양단에서 흐르는 전류를 측정함으로써, 단일 핵산의 길이 및 두께를 측정할 수 있는 가장 간단하지만 민감도가 높은 측정방법이다. 단백질을 이용한 나노포어의 불안정성과 단백질 포어의 크기 조절이 불가능하다는 단점을 극복하기 위해 개발된 다양한 인공 나노포어는 실리콘, 고분자등으로 구성되어 있다. 그리고, 개발된 나노포어는 제작 및 개발의 한계에 의해 상대적으로 짧은 PCR 생성물과 같은 핵산을 측정할 수 없었으나, 최근에 나노포어의 표면 개질을 통해, PCR 생성물 수준의 짧은 DNA를 측정할 수 있었다(49).

핵산의 기계적인 측정 기술의 대표적인 방법은 캔틸레버를 이용하는 기술이다. 캔틸레버 바이오센서는 MEMS 기술을 이용한 바이오센서 기술로써, 극미량의 화학 및 생체물질의 검출이 가능하고, 무표지 측정 또는 표지물질을 이용한 고감도 측정이 가능하다. 캔틸레버의 표면에 상보적인 핵산을 고정화하고 샘플핵산과 혼성화 반응을 일으키면, 캔틸레버의 변형을 간접적으로 측정하여 혼성화된 샘플 핵산의 농도를 측정할 수 있다(50).

이처럼 핵산을 이용한 박테리아 및 바이러스 측정방법은 비단 핵산 측정 기술 뿐만 아니라, 세포에서 핵산을 추출하고 어느 정도 정제를 해야 한다는 점에서 단백질을 이용하여 박테리아를 측정하는 방법과 큰 차이가 있다. 공정이 복잡해지는 단점이 있기는 하지만, 핵산을 이용할 경우는 단백질을 이용할 경우보다 높은 민감도를 가질 수 있기 때문에, 핵산을 이용한 환경 독성박테리아 및 바이러스 측정 기술은 앞으로도 계속 발전할 수 있을 것이다.

단백질칩

DNA (다옥시리보핵산)는 유전 정보의 전달자이자 단백질의 설계도이다. DNA의 설계에 의해 단백질은 생산된다. 유전자에 관한 연구는 서기 1990년 이후 인류의 가장 큰

관심사 중 하나였으며 2000년을 전후로 한 '게놈 프로젝트'의 진전으로 인간 유전자의 대부분이 이미 밝혀진 상태다. 그런데 유전자의 존재 의미는 단백질의 발현으로 바로 실현된다. 즉 '게놈 기능 연구'의 종착점은 단백질 연구다. 단백질은 생명의 최소 단위인 세포를 구성하고 생물의 생명 활동 유지에 필수적으로 작용한다. 이를 단백질체학(Proteomics)이라고 한다. 이는 발현되는 모든 단백질의 총합인 Proteom을 다루는 학문으로, 어떤 단백질이 얼마의 양으로 어떤 환경에서 발현되는가 하는 것을 파악함을 목적으로 한다(51). 이는 생명 현상을 이해함에 있어 DNA의 발현을 조사하는 것만큼 단백질의 분리 및 동정이 중요할 수 있음을 의미한다. 전통적으로 단백질의 분리 및 동정에는 2차원 전기영동법이 널리 이용되어 왔으나 많은 시료와 장시간의 처리 과정이 요구된다는 단점이 있었다. 단백질체학에 필수적으로 이용될 수 있는 핵심기술이자 상기 단점을 극복할 수 있는 기술이 바로 수십~수백의 단백질 혹은 리간드를 2차원 평면상에 고집적 고효율로 고정시켜 동시다발적 분석을 꾀하는 단백질 칩 (protein chip)이다(52-55). 인체를 구성하는 단백질이 백만 개를 넘을 것으로 알려진 만큼 이러한 단백질 칩을 이용하면 질병 진단, 단백질 발현 및 기능 연구, 단백질 상호 작용 연구, 신약 개발, 식품, 환경 등 다양한 분야로의 응용이 가능할 것으로 기대된다(56).

대량 스크리닝이라는 관점에서 단백질 칩의 기본 원리는 DNA 칩과 유사하다. 그러나 단백질 고유의 뛰어난 선택성을 활용한다는 점, 직접 생리 활성을 갖는 단백질을 대상으로 한다는 점에서 DNA 칩과는 분석원리와 응용범위의 차이가 있다. 문제는 단백질 칩이 상업적 제품화의 관점에서 수월한 기술만은 아니라는 사실이다. 첫째 DNA 칩에 비해 시장진입이 늦었다. 둘째 해당 단백질의 확보가 용이하지 않고 변성되기 쉽다. 셋째 생물학적 표면 제조의 어려움 등 기술적 난이도에 비해 제조원가는 높은 편이다(57, 58). 이상의 한계를 극복한다면 단백질 칩은 특유의 광범위한 연구개발 가능성을 실현시킬 수 있을 것으로 예상된다.

단백질 칩의 핵심 기술은 크게 두 가지로 요약 가능하다. 그 중 첫째는 단백질 칩 제작기술이다. 단백질 칩 제작기술은 기존 DNA 칩 제조공정으로부터 많은 영향을 받아 왔다. 그러나 단백질 칩 기술의 핵심적 열쇠는 둘째, 단백질 칩 분석기술이다. 단백질 칩에서는 시료의 증폭을 위해 사용되는 PCR (Polymer Chain Reaction)과 같은 증폭 기술이 없기 때문이다. 제작기술과 분석기술은 상호간 분리될 수 없는 밀접한 관계를 지닌다. 흔히 분석기술에 따라서 제작방법이 결정되는 까닭이다. 따라서 단백질 칩의 이해를 위해서는 단백질 분석방법에 대한 이해가 필수적이다. 단백질 칩의 분석은 단백질 상호작용이 화학적 반응과 단백질 3차 구조와 같은 여러 요인에 의해 결정되기 때문에 DNA 칩의 분석에 비해 많은 어려움을 가진다.

단백질 칩 분석 기술

고전적으로 단백질의 발현 양상은 전술한대로 2차원 전기영동-질량분석, 크로마토그래피-질량분석, 효소면역 측정

법 (ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 등에 의해 관찰되었다. 이상의 방법들로는 단백질을 발굴하고 규명하기까지 많은 시간과 비용이 소요되며 재현성을 기대하거나 연구자간의 표준화 및 자료 은행 구축이 어렵고 단백질체학에 적용하기 무리가 따른다. 따라서 단백질 칩을 위한 단백질 분석 방법으로는 형광분석방법, 질량분석방법, 표면 플라즈몬 공명방법 (SPR: Surface Plasmon Resonance) 등의 다양한 기술들이 제시되고 있다(59-61). 이중 형광분석방법은 단순하고 민감도가 높아 널리 사용되고 있으나 표지형 분석방법이라는 점에서 한계를 가진다. 또한 형광 표지된 단백질은 정량 분석의 정확도를 떨어뜨리기도 하는데 이는 표지 방법이 분자간의 결합을 변형시킬 수도 있기 때문이다(62). 대표적인 비표지적 분석방법인 표면 플라즈몬 공명법은 금 박막 상에서 단백질 상호작용 등의 원인으로 발생하는 박막 두께의 변화를 굴절률에 의해 분석하는 것이다(63, 64). 특히 이 분석법은 비표지적일 뿐만 아니라 분석 후 단백질을 회수할 수 있다는 점에서 큰 의미를 지닌다. 이처럼 표면 플라즈몬 공명법을 이용한 단일 스팟 형태의 단백질 칩에 관한 연구 결과가 Biacore (스웨덴)사에 의해 발표된 바 있다.

또 하나의 비표지적 분석방법인 MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)로 이는 시료 중 불순물 여하에 크게 영향을 받지 않으므로 준비가 간편하고 스펙트럼의 해석이 용이하여 혼합물 측정에 상당히 유리하다(65). 다만 플레이트 표면에 단단하게 붙은 단백질은 분석할 수 없고 시료의 회수가 불가능하다는 단점을 지닌다.

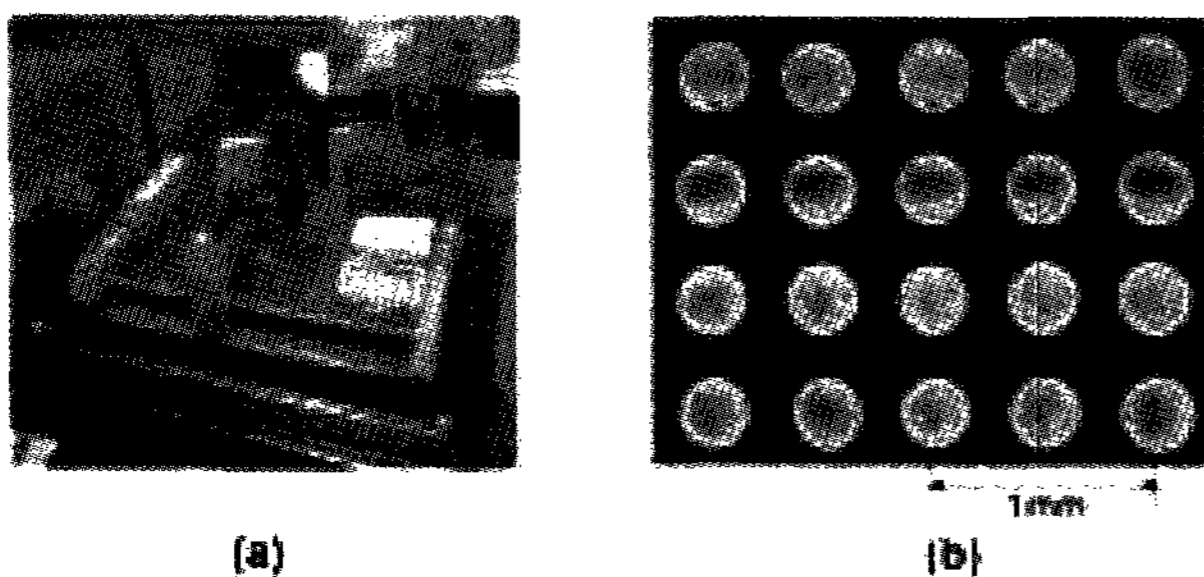


Figure 4. Protein chip fabricated by using microarrayer ((a) microarrayer, (b) fluorescent image of protein array).

단백질 칩 제작 기술

고정된 단백질은 극미량의 생물 물질이 선택적 감응으로 목표 물질을 인지하고 이로부터 신호를 발생시키는 부분이다. 이와 같은 단백질 고정화 기술은 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 첫째 약한 물리적 흡착이고 둘째 분자의 방향성과 밀도 조절, 그리고 친화적 활성 표면과 단백질 사이의 공유결합을 이용하는 것이다(66). 대표적인 고정화 기법에는 자기조립 Biotinylated 단백질, Ni²⁺킬레이트된 표면 위에 올려진 His-tagged 단백질 등의 기술이 있다(67-69). 단백질 칩 제작을 위한 또 하나의 핵심적 기술은 표면에 단백질을 패터닝하는 기술이다. 대표적으로 마이크로 배열장치 (ink-jet형, pin형)를 이용하여 일정량의 단백질을 패터닝하는 기술이 있다. Fig. 4-(a)는 마이크로 배열장치 (Nano-Plotter, GeSim, Germany)이며, Fig. 4-(b)는 (a)의

배열장치로 얻은 단백질 칩의 형광 이미지이다. 마이크로 배열장치를 이용한 단백질 패터닝은 높은 재현성에도 불구하고 나노수준으로의 한계를 보이며 성장이 주춤하지만 멀티화, 대량화에서 강점을 보인다. 또한 원자력간 현미경 (AFM: Atomic Force Microscope)을 이용하여 기판과 tip에 존재하는 분자들의 화학적 결합을 통하여 기판에 자가조립하는 기술이 Mirkin 교수에 의해 1999년 발표되면서 활발하게 연구되어지고 있는 딥 펜 리소그래피 (dip-pen lithography) 기술이 있다. Fig. 5는 딥 펜 리소그래피 기술을 이용하여 PSA 항체 분자들을 금 기판에 패터닝한 결과다. 딥 펜 리소그래피 기술은 나노 제조 공정 기술로써 다양한 응용분야를 창출하고 있다(70). 이 외에도 마이크로 컨택 프린팅 (micro-contact printing), 잉크젯 프린팅 (ink-jet printing), 전기분무법 (electrospray) 등이 있다.

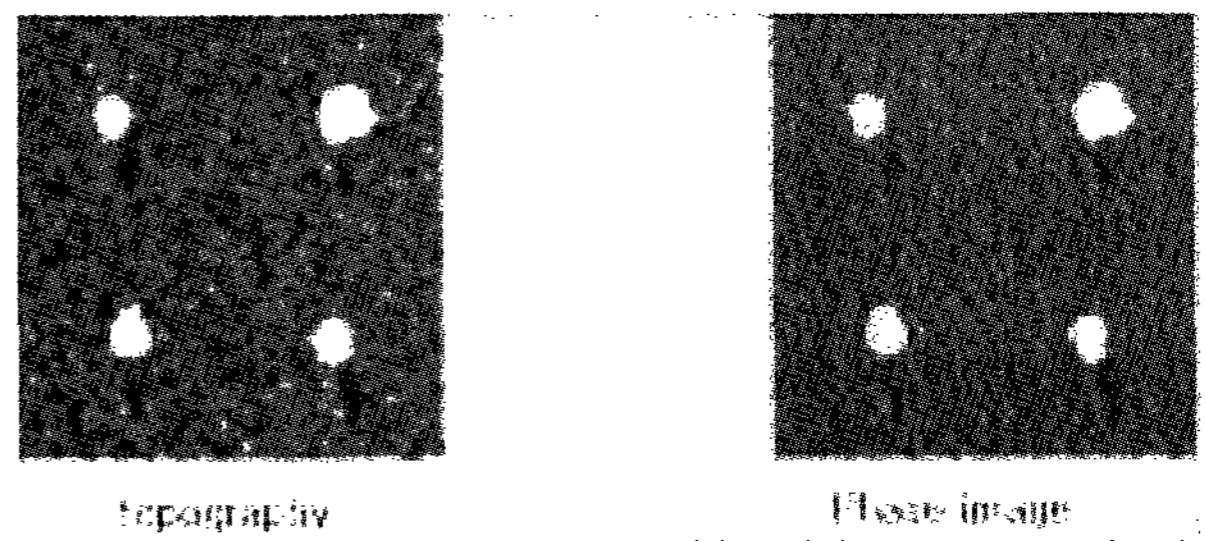


Figure 5. Nano-scale protein pattern fabricated by dipen nanolithography (pattern size: 500 nm).

단백질 칩은 생물학과 물리학, 표면화학, 유기화학 등 다양한 학문의 융합으로 탄생된다. 이는 학문으로의 단백질체학 뿐만 아니라 그 이용 범위가 DNA 칩에 비해 광범위하기 때문에 환경모니터링 뿐 아니라, 질병의 진단 및 단백질 발현 및 기능 연구, 신약 물질 개발에도 응용 가능성을 가진다.

세포칩

효소, 핵산, 항체 등을 이용한 기존의 바이오센싱기술은 생체소재와 측정대상간의 특이적 결합에 기초한 측정방법이었다. 이러한 방법은 측정대상의 정성적, 정량적 분석을 가능하게 하였으나, 생물체에 미치는 직접적인 영향을 측정할 수는 없었다. 따라서 살아있는 세포를 생체소재로 이용함으로써 측정대상 (특히, 독성물질의 경우)이 세포에 미치는 영향을 직접 측정하고자 하는 시도가 이루어져 왔다. 이러한 바이오센싱기법을 세포칩 또는 whole cell biosensor라고 하며 주로 신약개발 등에 중점적으로 활용되던 것이 최근에는 독성물질 탐지용으로 개발되어 환경모니터링에 본격적으로 응용되고 있다. 세포칩 개발을 위한 주요 요소 기술로는 고정화 기술 및 신호측정기술이 있다. 고정화기술은 high-throughput 세포칩의 개발을 위한 요소기술로 마이크로 또는 나노 크기의 패턴제작에서 핵심적 기술이다. Microcontact printing, microwell array, electrophoresis, ink jet printing 등의 다양한 고정화 기법에 개발되어 응용되고 있

다(71-73).

신호측정기법으로는 발색, 형광, 발광, 전기화학적/전기적 방법 등이 다양하게 개발되고 있으며, 광학적 방법으로 recombinant bioluminescent *Escherichia coli*를 이용한 간단한 독성탐지기법이 보고된 바 있다(74). Electrogenic cell (심근 세포, 신경세포 등)을 이용한 전기적 측정기법의 세포칩에 대한 연구도 최근 들어 활성화되고 있으며, 세포내로 마이크로 전극을 삽입하는 탐침 측정 기법과 마이크로 트랜스듀서를 이용하는 세포의 측정기법에 대한 연구가 이루어지고 있다.

본 연구진은 두 가지 인공 펩타이드 (CRG 12, CRG MAP)를 이용한 세포칩을 개발하여 발표하였으며, 사용된 두 종류의 펩타이드는 금표면에 자기조립박막을 형성하고, 세포가 표면처리된 기판에 고정화된 형태를 가지고 있다. 이 시스템을 이용하여 독성물질의 생물학적 독성을 surface plasmon resonance 장치를 이용하여 정량적으로 분석하였다(75).

결론

바이오센서나 바이오칩으로 불리는 바이오센싱 디바이스는 초창기 혈당센서 제품의 성공적인 시장진입에도 불구하고 이후 여러 가지 법률적 제한, 민감도의 한계 등으로 다양한 제품의 시장진입이 성공적이었다고 볼 수 없다. DNA chip의 기술이 확립되어있는 현재에도 시장에서의 위치는 아직 확고하다고 할 수 없으며 단백질칩기술은 이제 상용화의 길을 가고 있는 상황이라고 볼 수 있다. 여기에 신약스크리닝을 주 대상으로 세포칩기술이 선보였으며, 환경모니터링 등 타 분야로의 응용이 시도되고 있다. 현재는 바이오칩 기술을 선도하고 있는 회사들이 나타나고 있으며 최근 급속도로 발전하는 나노 기술과 결합할 경우 무한한 가능성을 가질 것으로 전망된다. 바이오센서 및 바이오칩 등 바이오센싱 분야에서 아직까지는 대부분의 시장을 임상진단, 의료용이 차지하고 있으나, 점차 식품, 환경 등 타 분야 시장규모가 전체에서 차지하는 비중이 커져가고 있고, 수많은 연구자들이 환경모니터링을 위한 바이오센싱 디바이스 연구, 개발에 노력하고 있는 것으로 보아 환경모니터링분야에서의 전망도 밝다고 본다.

요 약

바이오센싱 디바이스는 본질적으로 생체인식소재와 신호전달장치로 구성된 집적화, 소형화된 분석시스템으로 많은 장점을 가지고 있다. 고민감도, 선택도, 단순성, 다성분 측정능력, 즉시측정능력 뿐 아니라 매우 작고, 고가의 장치가 필요없는 장점이 있다. 바이오센싱 디바이스의 개발을 위해서는 두 가지의 핵심요소기술이 필요하다. 이것은 생체인식소재모듈의 제작 (리셉터 개발 및 고정화기법)과 신호발생기술을 포함한 신호전달장치의 개발이다. 효소, DNA/RNA, 단백질, 세포 등의 다양한 생체인식소재가 바이오센싱 디바이스 제작을 위해 이용되어져 왔고, 신호전달시스템도 전기화학적, 광학적, mass sensitive transducer를

중심으로 매우 활발히 연구되어져 왔다. 본 고에서는 최근 개발된 바이오센싱디바이스에 대해 다루고, 향후 전망에 대해 논하고자 한다.

감 사

본 연구는 한경대학교 2006년도 학술연구조성비의 지원에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Iwuoha, E. I., M. R. Smyth, and M. E. G. Lyons (1997), Organic Phase Enzyme Electrodes: Kinetics and Analytical Applications, *Biosens. Bioelectron.* **12**, 53-75.
- Campanella, L., F. Pacifici, M. P. Sammartino, and M. Tomassetti (1998), A New Organic Phase Biocatalytic Electrode for Lecithin Analysis in Food Products, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **47**, 25-38.
- Morales, M. D., M. C. González, B. Serra, A. J. Reviejo, and J. M. Pingarró (2005), Composite Amperometric Tyrosinase Biosensors for the Determination of The Additive Propyl Gallate in A Reversed Micellar Medium, *Sens. Actuators B* **106**, 572-579.
- Stanca, S. E. and I. C. Popescu (2004), Phenols Monitoring and Hill Coefficient Evaluation using Tyrosinase-Based Amperometric Biosensors, *Bioelectrochemistry* **64**, 47-52.
- Sánchez-Paniagua López, M., E. López-Cabarcos, and B. López-Ruiz (2006), Organic Phase Enzyme Electrodes, *Biomolecular Engineering* **23**, 135-147.
- Sánchez-Ferrer, A., J. N. Rodríguez López, F. Garcia-Canovas, and F. Garcia Carmona (1995), Tyrosinase: A Comprehensive Review of Its Mechanism, *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 1-11.
- Cosnier, S., C. Mousty, J. De Melo, A. Lepellec, A. Novoa, B. Polyak, and R. S. Marks (2004), Organic Phase PPO Biosensors Prepared by Multilayer Deposition of Enzyme and Alginate through Avidin-biotin Interactions, *Electroanalysis* **16**, 2022-2029.
- Varma, S. and B. Mattiasson (2005), Amperometric Biosensor for the Detection of Hydrogen Peroxide using Catalase Modified Electrodes in Polyacrylamide, *J. Biotechnol.* **119**, 172-180.
- Mulchandani, A. and S. Pan (1999), Ferrocene-conjugated m-Phenylendiamina Conducting Polymer-incorporated Peroxidase Biosensors, *Anal. Biochem.* **267**, 141-147.
- Andreescu, S., T. Noguier, V. Magearu, and J. L. Marty (2002), Screen-printed Electrode Based on AChE for the Detection of Pesticides in Presence of Organic Solvents, *Talanta* **57**, 169-176.
- Abad, J. M., F. Pariente, L. Hernández, H. D. Abruja, and E. Lorenzo (1998), Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Using A Piezoelectric Biosensor, *Anal. Chem.* **70**, 2848-2855.
- Fennouh, S., V. Casimiri, and C. Burstein (1997), Increased Paraoxon Detection Solvents Using Acetylcholinesterase Inactivation Measured With A Choline Oxidase Biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **12**, 97-104.
- Rehak, M., M. Snejdarkova, and T. Hianik (1997), Acetylcholine Minisensor Based on Metal-supported Lipid Bilayers for Determination of Environmental Pollutants, *Electroanalysis* **9**, 1072-1077.
- Choi, J. W., J. Min, W. H. Lee (1997), Signal Analysis of Fiber-optic Biosensor for the Detection of Organophosphorus Compounds in the Contaminated Water, *Korean J. of Chem. Eng.* **14**, 101-108.
- Trettnak, W., F. Reiningger, E. Zinterl, and O. S. Wolfbeis (1993),

- Fiber-optic Remote Detection of Pesticides and Related Inhibitors of the Enzyme Acetylcholinesterase, *Sensors and Actuators B* **11**, 87-90.
16. Choi, J. W., J. Min, J. W. Jung, H. W. Rhee, and W. H. Lee (1998), Fiber-optic Biosensor for the Detection of Organophosphorus Compounds using AChE-immobilized Viologen LB Films, *Thin Solid Films* **327-329**, 676-680.
 17. Choi, J. W., Y. K. Kim, I. H. Lee, J. Min, and W. H. Lee (2001), Optical Organophosphorus Biosensor Consisting of Acetylcholinesterase/Viologen Hetero Langmuir-Blodgett Film, *Biosens. Bioelectron.* **16**, 937-943.
 18. Choi, J. W., Y. K. Kim, S. Y. Song, I. H. Lee, and W. H. Lee (2003), Optical Biosensor Consisting of Glutathione-S-transferase for Detection of Captan, *Biosens. Bioelectron.* **18**, 1461-1466.
 19. Choi, J. W., Y. K. Kim, B. K. Oh, S. Y. Song, and W. H. Lee (2003), Optical Biosensor for Simultaneous Detection of Captan and Organophosphorus Compounds, *Biosens. Bioelectron.* **18**, 591-597.
 20. Federal Register (1989), Drinking Water, National Primary Drinking Water Regulations; Total Coliform; Total Coliforms (Including Fecal Coliforms and *E. coli*); Final Rules. Fed. Reg. 54. 27544-27568.
 21. APHA, AWWA, and WPCF (1992), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed., A.E. Greenberg, L.S. Clesceri, and A.D. Eaton, Eds., Am. Public health Assoc., Washington DC.
 22. Bordner, R., J. Winter, and P. Scarpino (Eds). Microbial Methods for Monitoring the Environment: Water and Eastes, EPA-600/8-78-017, Environmental Monitoring and Support Laboratory, US Enivron, Protect. Agency, Cincinnati.
 23. Edberg, S., M. J. Allen, D. B. Smith, and National Collavorative Study (1988), National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1595-1601.
 24. Min, J. and A. Baeumner (2002), Highly Sensitive and Specific Detection of Viable *Escherichia coli* in Drinking Water, *Analytical Biochemistry* **303**, 186-193.
 25. Hu, Y., Q. Zhang, and J. C. Meitzer (1999), Rapid and Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Bovine Faeces by a Multiplex PCR, *J. Appl. Microbiol.* **87**, 867-876.
 26. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, and J. Van der Noordaa (1990), Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids, *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 495-503.
 27. Nathaniel, C. C., S. Stelick, and C. A. Batt (2003), Nucleic Acid Purification Using Microfabricated Silicon Structures, *Biosens. Bioelectron.* **19**, 59-66.
 28. Malgorzata, W. A., S. D. Llopis, A. Wheatley, R. L. McCarley, and S. A. Soper (2006), Purification and Preconcentration of Genomic DNA from Whole Lysates Using Photoactivated Polycarbonate (PPC) Microfluidic Chips, *Nucleic Acids Research* **34**, e74-e79.
 29. Gusev, Y., J. Sparkowski, A. Raghunathan, H. Ferguson, Jr., J. Montano, N. Bogdan, B. Schweitzer, S. Wiltshire, S. F. Kingsmore, W. Maltzman, and V. Wheeler (2003), Rolling Circle Amplification -A New Approach to Increase Sensitivity for Immunohistochemistry and Flow Cytometry, *American Journal of Pathology* **159**, 63-69.
 30. Cao, Y. C., R. Jin, C. S. Thaxton, and C. A. Mirkin (2005), A Two-color-change, Nanoparticle-based Method for DNA Detection, *Talanta* **67**, 449-455.
 31. Williams, J. M., M. Trope, D. J. Caplan, and D. C. Shugars (2006), Detection and Quantitation of *E. faecalis* by Real-time PCR (qPCR), Reverse Transcription-PCR (RT-PCR), and Cultivation During Endodontic Treatment, *Journal of Endodontics* **32**, 715-721.
 32. Panelli, S., G. Damiani, L. Espen, G. Micheli, and V. Sgaramella (2006), Towards the Analysis of The Genomes of Single Cells: Further Characterisation of the Multiple Displacement Amplification, *Gene* **372**, 1-7.
 33. Yang, J. M., J. Bell, Y. Huang, M. Tirado, D. Thomas, A. H. Forster, R. W. Haigis, P. D. Swanson, B. R. Wallace, B. Martinsons, and M. Krihak (2002), An Integrated, Stacked Microlaboratory for Biological Agent Detection with DNA and Immunoassays, *Biosens. Bioelectron.* **17**, 605-618.
 34. Maylin, S., M. Martinot-Peignoux, N. Boyer, M. P. Ripault, C. Féray, M. H. Nicolas-Chanoine, and P. Marcellin (2006), 595 Evidence for Eradication of HCV, Assessed with Transcription Mediated Amplification (TMA), in Chronic Hepatitis C Patients with Sustained Virological Response to Therapy, *Journal of Hepatology* **44**, S221.
 35. Baeumner, A. J., R. N. Cohen, V. Miksic, and J. Min (2003), RNA Biosensor for the Rapid Detection of Viable *Escherichia coli* in Drinking Water, *Biosens. Bioelectron.* **18**, 405-413.
 36. Jeong, S. C., I. S. Pack, E. Y. Cho, E. S. Youk, S. Park, W. K. Yoon, C. G. Kim, Y. D. Choi, J. K. Kim, and H. M. Kim (2007), Molecular Analysis and Quantitative Detection of a Transgenic Rice Line Expressing a Bifunctional Fusion TPSP, *Food Control* **18**, 1434-1442.
 37. Pen, J. (2007), Voltametric Detection of DNA Hybridization Using a Non-competitive Enzyme Linked Assay, *Biochem. Eng. J.* **35**, 183-190.
 38. Edwards K. A. and A. J. Baeumner (2006), Analysis of Liposomes, *Talanta* **68**, 1432-1441.
 39. Stillitano, F., A. Mugelli, E. Cerbai, and S. Vanucci (2007), Quantification of Midkine Gene Expression in *Patella caerulea* (Mollusca, Gastropoda) Exposed to Cadmium Estuarine, *Coastal and Shelf Science* **75**, 120-124.
 40. Dyer, J., D. M. Chisenhall, and C. N. Mores (2007), A Multiplexed TaqMan Assay for the Detection of Arthropod-borne Flaviviruses, *Journal of Virological Methods* **145**, 9-13.
 41. Fodes-Papp, Z., B. Angerer, W. Ankenbauer, and R. Rigler (2001), Fluorescent High-density Labeling of DNA: Error-Free Substitution for a Normal Nucleotide, *J. Biotechnol.* **86**, 237-253.
 42. Chen, W. Y., W. P. Hu, Y. D. Su, A. Taylor, S. Jiang, and G. L. Chang (2007), A Multispot DNA Chip Fabricated with Mixed ssDNA/oligo (ethylene glycol) Self-assembled Monolayers for Detecting the Effect of Secondary Structures on Hybridization by SPR Imaging, *Sensors and Actuator B* **125**, 607-614.
 43. Jin, Y., W. Lu, J. Hu, X. Yao, and J. Li (2007), Site-specific DNA Cleavage of EcoRI Endonuclease Probed by Electrochemical Analysis Using Ferrocene Capped Gold Nanoparticles as Reporter, *Electrochemistry Communications* **9**, 1086-1090.
 44. Kerman, K., Y. Morita, Y. Takamura, and E. Tamiya (2003), Label-free Electrochemical Detection of DNA Hybridization on Gold Electrode, *Electrochemistry Communications* **5**, 887-891.
 45. Daniel, S., T. P. Raoa, K. S. Raob, S. U. Rani, G. R. K. Naidu, H. Y. Lee, and T. Kawai (2007), A Review of DNA Functionalized/grafted Carbon Nanotubes and Their Characterization, *Sensors and Actuators B* **112**, 672-682.
 46. Andreu, A., J. W. Merkert, L. A. Lecaros, B. L. Broglin, J. T. Brazell, and M. El-Kouedi (2006), Detection of DNA Oligonucleotides on Nanowire Array Electrodes Using Chronocoulometry, *Sensors and Actuators B* **114**, 1116-1120.
 47. Rhee, M. and M. A. Burns (2007), Nanopore Sequencing Technology: Research Trends and Applications, *Trends in biotechnology* **24**, 580-586.
 48. Im, H., X. J. Huang, B. Gu, and Y. K. Choi (2007), A Dielectric-modulate, *Nature Nanotechnology* **2**, 430-434.
 49. Kim, Y. R., J. Min, I. H. Lee, S. Kim, A. G. Kim, K. Kim, K. Namkoong, and C. Ko (2007), Nanopore Sensor for Fast Label-free Detection of Short Double-stranded DNAs, *Biosens. Bioelectron.* **22**,

- 2926-2931.
50. Carrascosa, L. G. (2006), Nanomechanical Biosensor: A New Sensing Tool, *Trends in Analytical Chemistry: TrAC* **25**, 196-206.
 51. Ha, K. S. and J. S. Yuk, (2004), Nano-bio Technology and Protein Chips, *Trends in Medical Research* **11**, 5-14.
 52. Blaws, A. S. and W. M. Reichert (1998), Protein Patterning, *Biomaterials* **19**, 595-609.
 53. MacBeath, G. and S. L. Schreiberet (2000), Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination, *Science* **289**, 1760-1763.
 54. Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, W. Gerstein, and M. Snyder (2001), Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips, *Science* **293**, 2101-2105.
 55. Kukar, T., S. Eckenrode, Y. Gu, W. Lian, M. Megginson, J. X. She, and D. Wu (2002), Protein Microarrays to Detect Protein-protein Interactions Using Red and Green Fluorescent Proteins, *Anal. Biochem.* **306**, 50-54.
 56. Mitchell, P. (2002), A Perspective on Protein Microarrays, *Nat. Biotechnol.* **20**, 225-229.
 57. Zhu, H. and M. Snyder (2003), Protein Chip Technology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 55-63.
 58. Kim, Y. K., B. K. Oh, and J. W. Choi (2004), *Prospective of Industrial Chemistry* **7**, 1-8.
 59. Service, R. F. (2003), Protein Arrays Step Out of DNA's Shadow, *Science* **289**, 1673-1675.
 60. Feng, H. P. (2000), A Protein Microarray, *Nature Structure Biology* **7**, 829-837.
 61. Snyder, M. and S. Field (2003), Protein Analysis on A Proteomic Scale, *Nature* **422**, 208-215.
 62. Kodadek, T. (2001), Protein Microarrays: Prospects and Problems, *Chem. Biol.* **8**, 105-116.
 63. Yuk, J. S., S. J. Yi, H. G. Lee, H. J. Lee, Y. M. Kim, and K. S. Ha (2003), Characterization of Surface Plasmon Resonance Wavelength by Changes of Protein Concentration on Protein Chips, *Sensor and Actuator B* **422**, 161-163.
 64. Yuk, J. S. and K. S. Ha (2004), Analysis of Immunoreactions on Protein Arrays by Using Wavelength-Interrogation-Based Surface Plasmon Resonance Sensors, *J. Korean Phys. Soc.* **45**, 1104-1108.
 65. Warren, E. N., P. J. Elms, C. E. Parker, and C. H. Borchers (2004), Development of a Protein Chip: A MS-Based Method for Quantitation of Protein Expression and Modification Levels Using an Immunoaffinity Approach, *Anal. Chem.* **76**, 4082-4092.
 66. Ferretti, S. S., D. A. Russel, K. E. Sapsford, and D. J. S. Richardson (2000), Self-assembled Monolayers: A Versatile Tool for the Formulation of Bio-surfaces, *Trends. Anal. Chem.* **19**, 530-540.
 67. Oh, B. K., Y. K. Kim, W. Lee, Y. M. Bae, W. H. Lee, and J. W. Choi (2003), Immunosensor for Detection of *Legionella pneumophila* using Surface Plasmon Resonance, *Biosens. Bioelectron.* **18**, 605-611.
 68. Ruiz-Taylor, L. A., T. L. Martin, F. G. Zaugg, K. Witte, P. Indermuhle, S. Nock, and P. Wagner (2001), Monolayers of Derivatized Poly(L-lysine)-grafted Poly(ethylene glycol) on Metal Oxides as a Class of Biomolecular Interfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 852-857.
 69. Sigal, G. B., C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger, and G. M. Whitesides (1996), A Self-Assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-Tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance, *Anal. Chem.* **68**, 490-497.
 70. Salaita, K., Y. Wang, and C. A. Mirkin (2007), Applications of Dip-pen Nanolithography, *Nature Nanotechnology* **2**, 145-155.
 71. Chen C. S., M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber (1997), Geometric Control of Cell Life and Death, *Science* **276**, 1425-1428.
 72. Kim, H. S., Y. M. Bae, Y. K. Kim, B. K. Oh, and J. W. Choi (2006), Antibody Layer Fabrication for Protein Chip to Detect *E. coli* O157:H7 Using Microcontact Printing Technique, *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 141-144.
 73. Jiang, X. Y., R. Ferrigno, M. Mrksich, and G. M. Whitesides (2003), Electrochemical Desorption of Self-assembled Monolayers Noninvasively Releases Patterned Cells from Geometrical Confinements, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2366-2367.
 74. Lee, J. H., C. H. Youn, B. . Kim, and M. B. Gu (2007), An Oxidative Stress-specific Bacterial Cell Array Chip for Toxicity Analysis, *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2223-2229.
 75. Choi, J. W., Y. S. Nam, and M. Fujihira (2004), Nanoscale Fabrication of Biomolecular Layer and Its Application to Biodevices, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 76-85.