

<기술논문>

DOI:10.3795/KSME-A.2008.32.4.371

분리식 PDMS/유리 중합효소연쇄반응칩 개발 및 유전적 남성불임 검사에의 응용

주진경* · 안유민† · 황승용**
(2007년 8월 9일 접수, 2008년 2월 14일 심사완료)

Development of Detachable PDMS/Glass PCR-Chip and It's Application to Detection of Male Infertility

Jin-Kyoung Ju, Yoomin Ahn and Seung-Young Hwang

Key Words : Polymerase Chain Reaction(중합효소연쇄반응), Detachable Biochip(분리식 바이오칩), Male Infertility(남성불임)

Abstract

Our precedent study has reported glass-PDMS (polydimethylsiloxane) based biochip for the gene PCR (polymerase chain reaction). To prevent the contamination of bio sample, the once used biochip must not be used repeatedly. However, the fabrication cost of microheater and microsensor of the biochip was not cheap to use it as a disposable chip. This paper proposes new PCR-chip where the glass substrate integrated with the microheater and microsensor is detachable from the reaction chamber where the sample is injected. That makes it possible to reuse the glass substrate repeatedly. The performance of the proposed detachable PCR-chip was compared with that of the precedent monolithic PCR-chip. The results showed that the SRY (sex determining Y chromosome) gene PCR was successfully performed in the detachable chip compared with the monolithic chip. However, the more efforts to improve the efficiency of surface treatment of PDMS chip are needed to increase the possibility of applying the detachable chip to the detecting of male infertility.

1. 서 론

바이오칩을 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)에 적용하기 위해서, 선행연구⁽¹⁾에서는 박막 형태의 히터와 온도 센서를 유리기판에 형성하고 마이크로 채널 형태의 반응조를 PDMS (polydimethylsiloxane)로 제작하여 이를 접합한 일체식(monolithic) 바이오칩을 제안하였다. 선행연구⁽¹⁾에서 제안된 칩은 폴리머 재질의 마이크로 채널

에 별도의 친수성 표면⁽²⁾처리 없이도 일반 생화학 실험실에서 쓰이는 마이크로 피펫 (micro pipette)만 으로 기포 발생 없이 안정적으로 시료주입이 간단히 이루어지며, 기존의 실리콘^(3,4)이나 유리⁽⁵⁾ 재질로만 제작된 칩이 가지고 있는 생화학적, 열적 단점을 개선하였다. 그러나, 기존의 실리콘이나 유리 재질 위주의 바이오칩에 비해 제작 비용이나 공정 시간이 개선되었지만 유리기판 위에 형성된 박막 히터와 센서는 일회용으로 사용하기에는 여전히 고가이며 제작에 많은 시간이 소요되는 문제점을 가지고 있다. 시료의 오염을 방지하기 위해서는 매 실험마다 새로 제작된 바이오칩의 사용이 요구되므로, 많은 반복 실험이 필요한 생화학 실험의 특성상 다수의 바이오칩 제작이 불가피하다. 그러므로 생화학 실험에 선행연구에서 제안된 바이오칩을 실제 적용하기에는 개선이 필요하였다.

† 책임저자, 회원, 한양대학교 기계공학과

E-mail : ahnym@hanyang.ac.kr

TEL: (031)400-5281 FAX : (031)436-8122

* 한양대학교 대학원 기계공학과

** 한양대학교 분자생명과학부

유전적 남성불임 검사를 위해, 환자의 Y 염색체 내에 정소분화와 정자생성 과정에 있어서 필수적인 유전자들이 결실되어 있는지를 알아보는 방법이 있다.⁶⁾ 따라서 불임환자에게 불임관련 유전자들이 결실되어 있는지를 알아보기 위해서, 환자의 피로부터 얻어진 유전자 함유 시료를 중합효소연쇄반응으로 대량 복제한 후 그 결과물 내의 불임관련 유전자 존재여부를 전기영동 등으로 확인하게 된다.⁶⁾ 전기영동으로 대상 유전자의 존재여부를 정확히 확인하기 위해서는 대상 유전자 양이 충분히 많아야 하기 때문에, 유전자를 대량 복제하는 데 사용되는 중합효소연쇄반응이 필요하게 된다. 실험실 일반장비에서 하던 중합효소연쇄반응을 마이크로 바이오칩 상에서 수행함에 따라 여러 이득이 있을 수 있는데, 선행연구⁽¹⁾ 경우에는 반응 수행에 필요한 시간을 크게 단축할 수 있었다.

본 연구에서는 많은 제작비용과 시간이 소요되는 박막 히터와 센서가 형성된 유리기관은 재사용하고 시료를 담게 되는 저가의 PDMS 반응조는 오염방지를 위해 일회용으로 사용하게 하기 위해서, 마이크로 채널 형태의 PDMS 반응조와 히터 및 센서가 만들어진 유리기관을 결합 및 분리할 수 있는 분리식(detachable) 바이오칩을 설계 및 제작하였다. 이렇게 개발된 분리식 바이오칩을 선행연구에서 연구된 일체식(monolithic) 바이오칩과 성능을 비교 평가하였다. 그리고 유전적 남성불임 검사를 위한 중합효소연쇄반응에 응용하여 보았다.

2. 분리식 중합효소연쇄반응 칩

2.1 분리식 칩 설계 및 열전달 시뮬레이션

전반적인 분리식 바이오칩의 형태는 선행연구⁽¹⁾의 일체식 바이오칩과 거의 일치하게 하였다. 즉, 시료를 담기 위한 마이크로 채널 형태의 반응조와 반응 온도 조절을 위한 마이크로 히터와 센서는 동일하게 설계 제작하였다. 다만, 선행연구⁽¹⁾에서 일체식 칩을 개발할 때에 시료와 금속 박막 히터가 반응하는 문제가 발생하였다. 따라서 500 μm 두께의 유리기관(Pyrex7740, Corning, USA) 표면에 마이크로 히터와 온도센서를 제작한 후, 유리기관의 히터와 센서가 제작된 면의 반대 면에 PDMS 반응조를 부착하였다. 이번 연구에서는 유리기관보다 얇은(100 μm) 덮개유리(Slide glass, MENZEL-GLASER, German)에 PDMS 반응조를 접착하고, 이 반응조 칩을 박막 히터와 센서가 제작된 유리기관

위에 밀착시킨 상태에서 중합효소연쇄반응 실험을 수행할 수 있게 분리식 바이오칩을 설계하였다. 반응실험 후에는 반응조 칩만 교체하고, 시료와 직접 접촉이 없는 히터와 센서가 형성된 유리기관 칩은 재사용하면서 또 다른 중합효소연쇄반응 실험들을 진행할 수 있도록 하였다.

분리식 바이오칩과 기존의 일체식 바이오칩의 열전달 효율을 비교하기 위해, 상용 프로그램인 CFD-ACE+ (ESI Group, France)를 이용하여 시뮬레이션을 실시하였다. 해석 조건으로, 시료는 탈이온수(deionized water)로 가정하였다. 탈이온수, PDMS, 그리고 유리기관 및 덮개유리의 열전도율은 각각 0.613, 0.17, 1.13 W/m-K로 가정하였다. 열전달 해석을 위해, 마이크로 히터에서 벽열원(wall heat source) 형태의 30,000 W/m² 열에너지가 발생되며 초기 온도는 실온 20°C 인 것으로 가정하였다. 바이오칩 내부와 칩들 사이에서는 전도 현상만을,

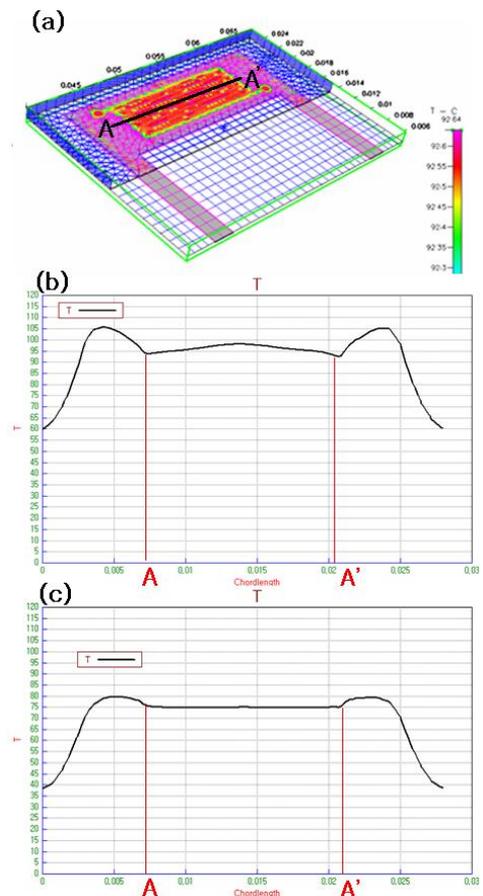


Fig. 1 Simulated thermal profile at inner surface of (a) detachable biochip after 3sec, and temperature distribution of (b) monolithic and (c) detachable chips in A-A' direction of (a)

그리고 바이오칩과 바깥 20°C 대기 사이에는 자연 대류 현상만을 고려하여 열전달 해석을 수행하였다. 가정된 대류 열전달계수 값은 $10 \text{ W/m}^2\text{-}^\circ\text{C}$ 이다. Fig. 1 (a)는 분리식 바이오칩의 히터에서 열이 발생되고, 초기상태로부터 3 초 후의 바이오칩 온도 분포를 시뮬레이션한 결과이다. Fig. 1 (b)는 (a)에 A-A' 로 표시된 방향으로의 마이크로채널 형태 반응조의 내부 온도분포를 그래프화 한 것이다. 똑같은 방법으로 일체식 바이오칩에서의 반응조 내부 온도 분포를 구한 것은 Fig. 1 (c)와 같다. Fig. 1 (b)와 (c)에서 A와 A' 표시 안쪽 구간이 반응조 내부에 해당한다. 반응조 내부의 A-A'방향으로, 즉 마이크로 채널 길이방향으로의 온도분포 범위에 대한 시뮬레이션 결과, 일체식 바이오칩은 92.0-92.5 °C 인 반면 분리식 바이오칩은 90.0-90.5 °C 이다. 온도편차가 일체식과 분리식 둘 다 0.5 °C 이내이므로, 두 형태의 바이오칩 모두 중합효소연쇄반응이 비교적 균일한 반응조 온도 상태에서 원활히 이루어지리라 예견된다. 그러나 승온속도는 분리식 보다 일체식 바이오칩이 다소 우수한 것으로 나타났다. 이것은 분리식 보다는 일체식에서 히터에서 발생하는 열에너지가 반응조에 효율적으로 잘 전달되는 때문이라 생각된다.

2.2 반응조 칩과 히터 및 센서 칩 제작

Fig. 2 은 마이크로 히터 및 센서 칩 그리고 반응조 칩 제작공정을 보여준다. 먼저 히터 및 센서 칩의 경우, 표면의 유기물을 제거한 유리기판에 열기상 증착법 (thermal evaporation)을 이용하여 크롬과 금을 각각 $200\text{\AA}/1000\text{\AA}$ 두께로 증착시킨다. 그 다음엔, 사진식각(photolithography) 기법을 이용하여 유리기판 위에 증착된 금속박막 층을 마이크로 히터와 마이크로 온도센서의 설계 형상대로 형태화(patterning)을 한다. 전기적 절연을 위해 형태화된 면 위에 산화막 (SiO_2)을 $1 \mu\text{m}$ 두께로 강화화학기상증착 (PECVD)법을 이용해 증착한다. 끝으로 증착된 산화막 중에 꽃이틈 (slot, PCC1, Hirose, Korea)을 통해 전기 신호를 수신할 부분만을 사진식각 및 B.O.E (buffered oxide etchant) 용액의 습식식각(wet etching)으로 제거하여 마이크로 히터 및 센서 유리기판 칩을 완성한다.

반응조 칩은 대량생산에 적합한 복사형틀법 (replica molding)을 이용하여 저렴한 PDMS 으로 마이크로 채널 형태의 반응조를 만들고 이를 싸게 구할 수 있는 광학현미경용 덮개유리에 부착시켜 제작하였다. 제작 순서로서 맨 먼저, 실리콘 웨이퍼 위에 음성후막감광제 (negative photoresist)인

SU-83035 (Microchem, USA)를 $100 \mu\text{m}$ 두께로 스핀 코팅 한 후 사진식각 기법으로 반응조 형틀(mold)을 만든다. 제작된 형틀에 액체상태의 PDMS 를 형틀에 붓고 경화시킨다. 고체상태로 굳어진 PDMS 를 형틀에서 벗겨낸 후 설계된 형상으로 잘라서 PDMS 칩을 완성한다. 완성된 PDMS 칩을 $100 \mu\text{m}$ 두께의 덮개유리와 산소 플라즈마 표면처리법에 의해 접합하여 최종 저렴한 반응조 칩을 완성한다.

완성된 칩의 사진은 Fig. 3 과 같다. Fig. 3 에서 (a)는 분리식 바이오칩의 반응조 칩이고 (b)는 분리식 바이오칩의 마이크로 히터 및 센서 칩 부분이다. (c)는 선행연구에서 개발된 일체식 바이오칩이다. 하나의 완전한 중합효소연쇄반응용 바이오칩을 만드는 비용을 비교해 보다면, 분리식 칩이 일체식 칩보다 덮개유리 비용이 더 추가된다. 하지만 많은 횟수의 실험이 요구되는 경우, 히터 및 센서 칩은 반복하여 사용을 하고 PDMS 와 덮개유리로 제작되는 반응조 칩의 제작비용만 필요한 실

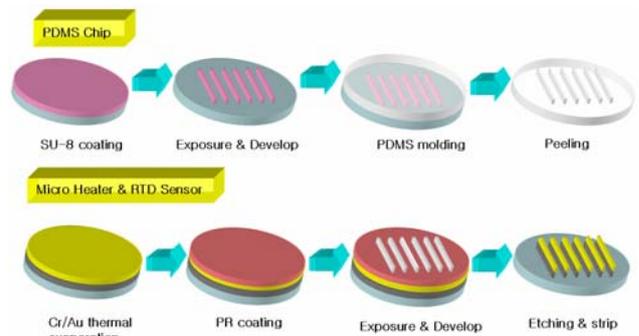


Fig. 2 Fabrication process of detachable PCR-chip

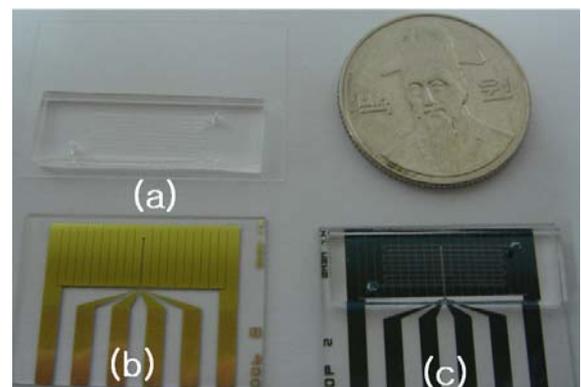


Fig. 3 Photograph of fabricated PCR chips; (a) PDMS reaction chip, (b) glass heater-sensor chip, and (c) monolithic chip

힘 횡수만큼 소요된다. 따라서 반응 실험에 필요한 바이오칩의 개수가 많아질수록, 칩들을 전체 제작하는 비용 및 시간은 분리식 바이오칩이 경제적이다.

3. 중합효소연쇄반응 칩의 성능평가

3.1 중합효소연쇄반응 온도순환

중합효소연쇄반응은 DNA (deoxyribonucleic acid)를 선택적으로 대량 복제하는 기술이다. 중합효소반응을 통해 DNA를 복제할 경우 DNA 중합효소 (polymerase)를 사용한다. 중합효소연쇄반응은 3 단계 과정에 의해 유전자 복제가 이루어진다. 각 단계별로 필요한 반응온도가 다른데, 3 단계 복제 과정이 한 주기가 되며, 이를 반복적으로 행함으로써 유전자가 대량으로 복제되는 것이다. 이러한 주기적인 복제과정은 주기적인 중합효소연쇄반응의 각 단계별 온도 순환제어가 필요하다. 개발된 분리식 칩과 기존의 일체식칩의 성능평가로서 먼저, 각각의 바이오칩 내에서 실제 이루어지는 반응온도 사이클의 정확도를 측정 비교하여 보았다.

중합효소연쇄반응의 각 순환주기의 첫 1 단계 변성(denature)에서는 92-97°C의 온도에서 복제할 이 중가닥의 DNA (template)를 상호 분리시킨다. 다음 2 단계 결합(annealing)에서는 42-70°C에서 시발체 (primer)라 불리우는 두 종의 뉴클레오티드는 분리된 두 DNA 가닥의 상보적 서열에 혼성화된다. 마지막 3 단계 신장(extension)에서는 65-85°C에서 DNA 중합효소가 네 개의 디옥시리보뉴클레오티드를 이용하여 두 시발체로부터 DNA 합성을 시작한다. 중합효소연쇄반응 칩 반응조 내의 시료 온도 순환은 선행연구⁽¹⁾에서 구축된 시스템을 사용하여 실행하였다. 즉, 전원공급기를 통해 바이오칩의 히터 저항체에 전압을 공급하고, 바이오칩의 온도센서에서 나오는 전압을 신호처리기로 증폭하여 컴퓨터 제어기에 전달하면, 전달된 전압 값으로 바이오칩의 반응조 온도를 계측하고 원하는 반응온도에 맞게 히터전압을 조정하게 된다. 제작된 칩에 시료대신 탈이온수를 넣고 중합효소연쇄반응 온도순환을 구현했을 때, 칩 내 반응조에서의 실제 온도를 알아보기 위하여 K-type 열전대를 사용하였다. 정확한 측정을 위해서는 열전대를 반응조 내에 꽂아서 측정을 하여야 되지만, 액체인 탈이온수의 밀봉이 쉽지 않아 유리기관 칩 표면의 히터 부위 중앙에 열전대를 부착하여 온도를 측정하였다.

Fig. 4는 측정된 값을 그래프로 나타낸 것이다. 측정을 위해 설정된 중합효소연쇄반응의 각 복제단계별 온도는, 1 단계가 94°C, 2 단계가 55°C, 그리고 3 단계가 65°C이다. 측정 결과 기존의 일체식 칩의 경우 평균 승온 및 냉각 속도가 각각 8.1°C/s, 5.96°C/s로 나타났다. 반면 새로 제안된 분리식 칩은 각각 8.56°C/s, 6.1°C/s이다. 승온 및 냉각 속도 면에서 두 칩이 크게 차이는 없지만, 분리식 칩에서 약간 좋은 결과를 보이고 있다. 측정된 값은 실제 반응조 내의 온도가 아니라 히터 부위의 온도이므로 실제 반응조 내에서의 승온 및 냉각 속도는 앞선 시뮬레이션의 결과로 보아 일체식 칩에서 약간 좋으리라 예상된다.

3.2 중합효소연쇄반응 실험

분리식 칩이 일체식 칩과의 순환온도 비교 실험을 통해 중합효소연쇄반응에 적용 가능한 것을 확인하였기에, 중합효소연쇄반응 실험을 수행하여 두 칩의 실제 성능을 비교하여 보았다. 중합효소연쇄반응 실험을 통해 증폭한 염기 서열 유전자는 남성의 Y 염색체에 존재하는 SRY (sex determining Y chromosome) 유전자이다. 이 유전자는 남성고환 (testicle)의 분화와 발생과정에서 발현되는 유전자

Table 1 Sample composition for SRY gene PCR. (Total volume; 13 μ l)

Component	Quantity (μ l)
Nuclease free water	5.22
10X Buffer	1.3
dNTP	1.08
Primer SRY F	0.5
Primer SRY R	0.5
Additive [BSA]	0.9
Template(100ng/ μ l)	2.5
Taq polymerase (5unit/ μ l)	1.0

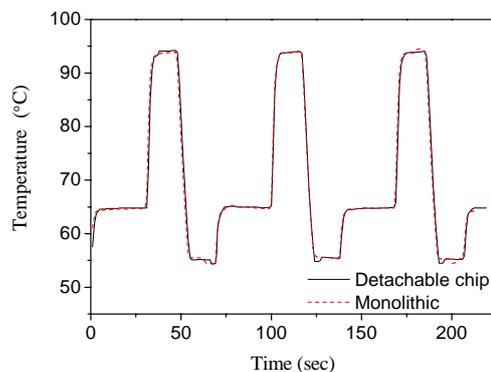


Fig. 4 Thermal cycling of fabricated detachable and monolithic PCR chips

이다. SRY 유전자는 정상 가임 남성의 경우 항상 발견되기 때문에 대부분의 남성 불임 관련 유전자 실험에 있어서 양성대조(positive control) 유전자로서 역할을 한다.⁽⁶⁾ 즉, 남성 불임 관련 유전자에 관련한 중합효소연쇄반응 실험을 할 때, SRY 유전자를 양성대조용으로 사용함으로써 실험의 기준을 세울 수가 있는 것이다.

실험에 사용된 시료 혼합액의 조성 및 농도는 Table 1 과 같다. 선행연구⁽¹⁾에서는 시료 혼합액을 13 μl 로 만든 후에 이 중 10 μl 를 일체형 칩에 주입했었다. 이번 분리형 칩에서는 PDMS 칩 두께를 줄여서 주입구(inlet)와 추출구(outlet)의 부피가 작아지게 하여, 보다 적은 양인 6.5 μl 의 시료를 칩에 주입하게 되었다. 칩에서의 중합효소연쇄반응은 먼저 변성 전 단계(pre-denature)로 94°C 에서 240 초 반응 1 회, 변성 단계(denature)로 94°C에서 15 초 반응, 결합 단계(annealing)로 60°C에서 15 초 반응, 신장 단계(extension)로 72°C에서 30 초 반응을 35 회 순환반복 후 마지막으로 신장 후 단계(post-extension)로 72°C에서 300 초 반응 1 회로 수행하였다.

중합효소연쇄반응 실험을 새로 제안한 분리형 칩과 선행연구의 일체형 칩 들에서 각각 2 회씩 동일하게 실행하였다. Fig. 5 는 각각의 칩 들에서의 결과물 중 5 μl 씩을 추출하여 2% 아가로우즈 겔(agarose gel) 전기영동법을 수행한 결과사진이다. 증폭한 SRY 유전자 크기는 500bp 이다. 중합효소연쇄반응으로 대상 유전자가 정확하게 많은 양이 복제되었을 경우, 겔 전기영동 사진에서 유전자 띠 형상이 뚜렷해진다. 사진 맨 왼쪽의 DNA 지표 띠(100bp DNA ladder, Promega)와 비교해 보면 분리형 칩과 일체형 칩 상에서 500bp 크기의 유전자 복제가 모두 올바르게 이루어졌으며, 띠 뚜렷함 정도를 비교하여 보면 복제 효율도 비슷한 수준임을 확인할 수가 있다.

4. 유전적 남성불임 검사용 PCR

4.1 첨가제 BSA 의 최소 필요량

유전적 남성불임 검사에 사용되는 SRY 유전자 중합효소연쇄반응에 관한 선행연구⁽¹⁾에서 PDMS 칩 표면에 시료의 흡착을 방지하기 위해서 능동적 표면 처리법^(7,8) (dynamic coating)을 이용하였다. 즉 BSA(bovine serum albumin)를 첨가제로 시료에 넣어 첨가제가 시료 내의 효소와 유전자 등 보다 먼저 칩 표면에 흡착하여 다른 생화학 시료의 흡착

을 방지하게 하였다. 하지만 일반 중합효소연쇄반응에서는 BSA 첨가제를 사용하지 않으므로, 유전자 복제효율을 높이기 위해서라도 되도록이면 최소량의 BSA 첨가제를 사용하는 것이 바람직하겠다. 따라서 분리형 바이오칩에서 시료 혼합액 내의 BSA 첨가량 변화에 따른 복제효율을 알아보는 실험을 실시하였다. BSA의 첨가량 변화를 0.9, 0.6, 0.3, 0.0 μl 로 하였다. 시료 내의 BSA 첨가량이 줄어든 만큼 핵산가수분해효소 유리수(nuclease free water)를 5.22, 5.52, 5.82, 6.12 μl 로 더 첨가함으로써, 총 시료 혼합액의 양을 항상 13 μl 로 만들어 다른 시료들의 농도는 Table 1 에서와 같이 유지하였다.

Fig. 6 은 여러 BSA 농도 들에 대해서 SRY 유전자 중합효소연쇄반응을 수행한 후, 그 결과물들을 겔 전기영동한 결과이다. 실험결과에 의하면 BSA

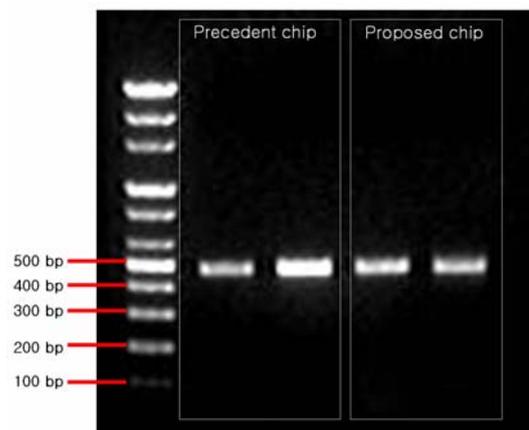


Fig. 5 Photograph of gel electrophoresis after SRY gene PCR by the precedent monolithic chip and the proposed detachable chip

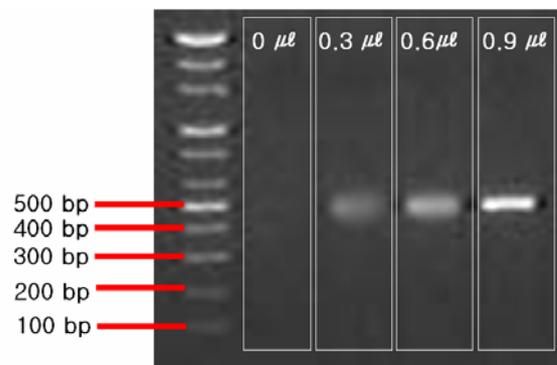


Fig. 6 Photograph of gel electrophoresis after SRY gene PCR by the detachable chip. The composition of BAS additives in 13 μl sample for each PCR operation is also shown

를 전혀 첨가하지 않을 경우에는, 전기영동 후에 유전자 띠가 육안으로 발견되지 않는다. 이는 중합효소연쇄반응에 의한 유전자 복제가 원활히 이루어지지 않았다고 할 수 있겠다. BSA 첨가제가 없는 경우에는 유전자와 중합효소 등이 PDMS 칩 표면에 흡착됨으로써, 중합효소연쇄반응이 원활히 이루어지지 않았기 때문이다. 또한, BSA의 농도가 커질수록 전기영동된 유전자 띠의 뚜렷함이 강해졌다. 이것은 BSA가 많이 첨가될수록 바이오 시료의 흡착방지 효과가 커지는 때문이라 여겨진다. 원활한 중합효소연쇄반응을 위해서는 일정량 이상의 BSA 첨가제가 필요하겠다. 본 연구의 분리식 바이오칩 경우에는 유전자의 확실한 식별을 위해서는 최소 0.6 μl 의 BSA 첨가제가 필요하다고 하겠다.

4.2 유전자 주형(template)의 복제가능 최소농도

불임집단 환자로부터 추출된 유전자 샘플이 매우 미량인 경우에도 중합효소연쇄반응에 의해 유전자 복제가 가능한 것이 바람직하겠다. 선행연구의 일체식 칩에서는 복제대상 유전자 주형(template)의 농도가 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 의 경우에 대해서 중합효소연쇄반응을 실행하였다. 하지만, 일반 생화학 실험실에서 이루어지는 중합효소연쇄반응의 경우 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 의 유전자 주형만으로도 증폭이 가능하다. 따라서, 새로 제안된 분리식 칩에서 중합효소연쇄반응이 가능한 유전자 주형의 최소농도를 구하는 실험을 수행하였다. 유전자 주형 농도 들을 100, 80, 60, 40 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 로 줄이면서 중합효소연쇄반응 실험을 하였다. 각각의 실험에서 유전자 주형 농도는 변화되었지만, 총 시료 혼합액에 함유된 각 시료의 양은 Table 1과 같이 일정하게 하였다. 즉 실험마다 유전자 주형 농도는 변화되어도, 13 μl 시료 혼합에 쓰인 유전자 주형 함유 시료의 양은 2.5 μl , BSA 양은 0.9 μl , 그리고 핵산가수분해효소 유리수의 양은 5.22 μl , 등으로 일정하게 하였다. 유전자 주형 농도를 달리하면서 SRY 유전자 중합효소연쇄반응을 수행하였고, 그 결과물들을 겔 전기영동을 한 결과사진이 Fig. 7과 같다. 전기영동 사진에 의하면, 유전자 주형 농도가 60 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 일 때까지는 유전자 복제가 충분히 이루어졌다. 하지만 농도가 40 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 이하일 때에는 복제가 충분치 못한 때문인지, 유전자 띠가 분명히 않게 나타났다. 일반 실험실에서 가능한 유전자 주형 농도에 비해 분리식 칩을 통한 중합효소연쇄반응을 수행하기에 필요한 최소 농도가 아직 큰 편이다. 이것은, BSA로 표면처리를 하였지만, 유전자

및 효소 등의 PDMS 칩 표면에서의 흡착이 완전히 방지되지 않은 이유이라 여겨진다.

4.3 Taq 중합효소(polymerase)의 최소 필요량

기존의 생화학 실험실에서 이루어지는 중합효소연쇄반응을 바이오칩으로 수행하는 장점 중의 하나는, 훨씬 적은 시료의 사용으로 인해 시간과 비용이 감소되는 것이다. 선행연구⁽¹⁾에서 일체식 칩으로 중합효소연쇄반응을 수행할 때에, 전체 시료 혼합액 양을 기존의 생화학 실험에 비해 약 1/10로 줄일 수 있었다. 하지만 시료 중 가장 고가인 Taq중합효소의 경우, 기존의 일반 실험실 방법에서는 0.2 μl 이 사용되었으나 바이오칩에 의한 반응 실험에서는 5 배인 1 μl 가 사용되었다. 따라서 분리식 칩에서 SRY 유전자 중합효소연쇄반응을 할 때에, 고가의 시료인 Taq중합효소의 양을 얼마나 줄일 수 있나를 알아보는 실험을 수행하였다. Taq 중합효소의 양을 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 μl 로 줄여보

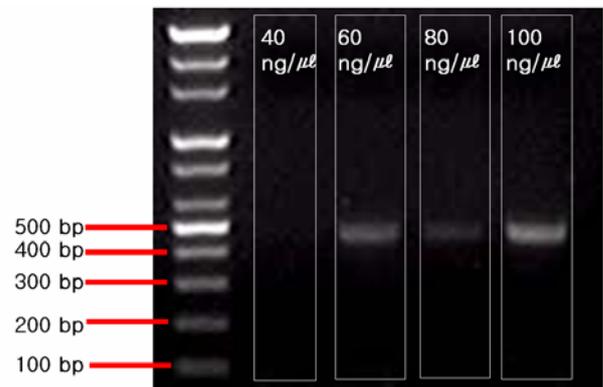


Fig. 7 Photograph of gel electrophoresis after SRY gene PCR by the detachable chip. The concentration of template for each PCR operation is also shown

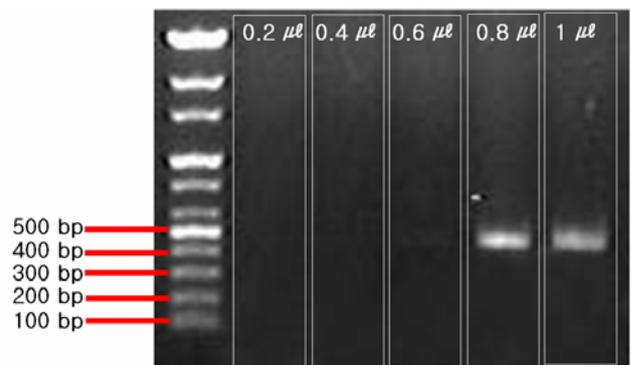


Fig. 8 Photograph of gel electrophoresis after SRY gene PCR by the detachable chip. The composition of Taq polymerase in 13 μl sample for each PCR operation is also shown

았다. 그리고 중합효소 양을 줄이는 대신, 핵산가수분해효소 유리수의 양을 상대적으로 5.22, 5.42, 5.62, 5.82, 6.02 μl 로 증가시켜서, 전체 시료 혼합액의 총 양이 13.0 μl 로 일정하게 유지되도록 조절하였다. 그리고 BSA 첨가량을 0.9 μl , 유전자 주형 함유 시료 양은 2.5 μl 로 하는 등, 다른 성분의 양은 Table 1에 표기된 것과 동일하게 하였다. 각 Taq 중합효소 양에 대한 SRY 유전자 중합효소연쇄반응 실험을 앞선 실험에서와 동일한 반응방법으로 실행하고 그 결과물들을 겔 전기영동한 결과가 Fig. 8과 같다. 실험 결과, 중합효소가 0.8 μl 까지 줄어도 원활한 유전자 복제가 된 결과로 판명된다. 중합효소가 0.6 μl 에서는 전기영동 사진에서 매우 미약한 유전자 띠가 보이고 있다. 중합효소 반응이 이루어지기 했지만, 유전자 복제가 충분치 못한 것 같다. 이와 같은 결과에 의하면, 일반 실험실에서의 중합효소연쇄반응에 비해 아직 많은 양의 유전자 주형과 중합효소가 필요하다는 단점이 분리식 PDMS/유리 바이오칩에 있다고 하겠다. 이러한 결과에 대한 원인 중의 하나가 유전자 및 효소 등의 PDMS 칩 표면 흡착 문제가 완전히 해결되지 못한 것이라 여겨진다.

5. 결 론

본 논문은 일회용으로 사용하기에는 많은 비용과 시간이 드는 기존의 일체식 바이오칩을 유리기판에 형성된 히터 및 센서 칩과 저렴한 PDMS 반응조 칩으로 분리시켜, 유리기판칩은 영구적으로 사용할 수 있게 하고 반응조 PDMS 칩은 일회용으로 사용할 수 있게 하였다. 열전도 효율 시뮬레이션 및 실제 중합효소연쇄반응 실험 결과에 의하면, 새로 개발된 분리식 칩이 기존의 일체식 칩에 비해 칩 성능이 뒤지지 않았다. 그리고 분리식 바이오칩이 칩 제작 단가 및 시간이 상대적으로 적게 드는 장점 외에 유전적 남성불임 검사용 중합효소연쇄반응에 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다. 그러나 일반 실험실 방법에 비해서 아직

고 농도의 유전자 주형과 많은 양의 비싼 효소가 필요한 단점이 발견되었다. PDMS 재질 위주의 바이오칩 성능을 보다 향상시키기 위해서는, 무엇보다도 유전자 및 효소의 흡착 방지를 위한 PDMS 칩 표면 처리 효과를 향상시키는 노력이 필요하겠다.

참고문헌

- (1) Cho, C.-H., Cho, W., Ahn, Y. and Hwang, S.-Y., 2006, "PDMS/Glass Serpentine Microchannel Chip for PCR with Bubble Suppression in Sample Injection," *Trans. of the KSME (A)*, Vol 30, No. 10, pp. 1261 ~ 1268.
- (2) Cho, W., Ko, Y.-J., Ahn, Y., Yoon, J.-Y. and Cho, N., 2006, "Surface Modification Effect of Wettability on the Performance of PDMS-Based Valve-less Micropump," *Key Eng. Mater.*, Vols. 326-328, pp. 297~300.
- (3) Northrup, M. A., Bennett, B., Hadley, D., Landre, P., Lehw, S., Richards, J. and Stratton, P., 1998, "A Miniature Analytical Instrument for Nucleic Acids Based on Micromachined Silicon Reaction Chambers," *Anal. Chem.*, Vol. 70, pp. 918~922.
- (4) Schneegaß, I., Brautigam, R. and Kohler, J. M., 2001, "Miniaturized Flow-Through PCR with Different Template Types in a Silicon Chip Thermocycler," *Lab Chip*, Vol. 1, pp. 42~49.
- (5) Giordano, B. C., Copeland, E. R., Landers, J. P., 2001, "Towards Dynamic Coating of Glass Microchip Chambers for Amplifying DNA via the Polymerase Chain Reaction," *Electrophoresis*, Vol. 22, pp. 334~340.
- (6) Park J.E., 2002, *Development of DNA Chip for Man Infertility*, M.S. Thesis, Hanyang University.
- (7) Erill, I., Campoy, S., Erill, N., Barbé J. and Aguiló, J., 2003, "Biochemical Analysis and Optimization of Inhibition and Adsorption Phenomena in Glass-Silicon PCR-chips," *Sens. Actuator B-Chem.*, Vol. 96, pp. 685~692.
- (8) Giordano, B. C., Ferrance, J., Swedberg, S., Hühmer, A. F. R. and Landers, J. P., 2001, "Polymerase Chain Reaction in Polymeric Microchips: DNA Amplification in Less Than 240 Seconds," *Anal. Biochem.* Vol. 291, pp. 124~132.