

유리비드를 포함한 PDMS 마이크로칩을 이용한 고감도 감염성 병원균 측정에 관한 연구

원지영¹ · 민준홍^{2*}

¹서강대학교 화공생명공학과, ²경원대학교 바이오나노대학

Highly Sensitive Detection of Pathogenic Bacteria Using PDMS Micro Chip Containing Glass Bead

Ji Yeong Won¹ and Junhong Min^{2*}

¹Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea

²College of Bionano technology, Kyungwon University, Gyunggi 461-701, Korea

Abstract Here, we demonstrated simple nucleic acid, RNA, concentration method using polymer micro chip containing glass bead (100 μm). Polymer micro chip was fabricated by PDMS (1.5 cm x 1.5 cm, 100 μm in the height) including pillar structure (160 μm (l) x 80 μm (w) x 100 μm (h), gap size 50 μm) for blocking micro bead. RNA could be adsorbed on micro glass bead at low pH by hydrogen bonding whereas RNA was released at high pH by electrostatic force between silica surface and RNA. Amount of glass beads and flow rate were optimized in aspects of adsorption and desorption of RNA. Adsorption and desorption rate was measured with real time PCR. This concentrated RNA was applied to amplification micro chip in which NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) was performed. As a result, *E.coli* O157:H7 in the concentration of 10 c.f.u./10 mL was successfully detected by these serial processes (concentration and amplification) with polymer micro chips. It implies this simple concentration method using polymer micro chip can be directly applied to ultra sensitive method to measure viable bacteria and virus in clinical samples as well as environmental samples.

Keywords: RNA, Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), PDMS, nucleic acid concentration

서 론

환경샘플 (강의 상, 하류, 생활하수 등)에서 병원균의 존재 유무 진단은 인류를 건강과 생활의 질의 개선을 목적으로 하는 수질환경개선 사업에서 매우 중요한 공정이다 [1]. 병원균의 존재 유무를 진단하는 방법은 지속적으로 연구가 진행되고 있으며 특히 DNA/RNA와 단백질을 이용한 분자 진단 방법을 주로 이용한다 [2]. 그 중에서 DNA는 PCR이라는 강력한 증폭기술에 의해 진단의 감도를 높일 수 있을뿐더러 [3], 측정기술의 발전으로 인하여 DNA를 주로 이용하고 있으며, 이러한 DNA를 이용한 분자진단 시장은 DNA 칩 어레이를 비롯하여 real time PCR (rt-PCR) 기기를 주로

이용하며 나날이 발전하고 있다 [4].

그러나, 감염성 병원균 진단의 대상이 박테리아뿐만 아니라 바이러스로 확장될 때, 기존의 DNA를 이용한 진단방법에는 한계가 있을 뿐 아니라, 병원균의 생존을 검사 시 많은 오차를 보여주고 있다 [5]. 그러므로 DNA가 아닌 RNA로 감염성 병원균을 측정하고자 하는 시도가 1990년 초부터 활발히 진행되고 있다 [6-8]. 그 중 mRNA를 이용한 진단 방법은 수질 샘플뿐만 아니라 식품에서 살균 후, 감염성 병원균의 생존율을 측정에 사용하고 있으며, 병원균의 생존율을 확실하게 검증할 수 있고, 인체 감염 시에도, 박테리아나 바이러스 진단도 가능하기 때문에 DNA를 측정하는 방법보다 유리하다 [7,9].

그럼에도 불구하고 DNA에 의한 진단 방법이 RNA에 의한 진단 방법보다 활발히 사용되고 있는 이유는 RNA가 RNase 오염에 의한 진단 오류가 발생하기 쉽고 RNA 진단 시 시료의 작은 오차에도 진단 오류가 빈번히 발생하여 전문

*Corresponding author

Tel: +82-31-750-8553, Fax: +82-31-750-8984

e-mail: jmin@kyungwon.ac.kr

적인 기술이 필요로 하기 때문이다 [10].

이러한 문제점을 해결하기 위해 고안된 방법은 진단의 모든 프로세스를 마이크로 칩에서 수행하는 Lab On a Chip (LOC)을 개발하는 것이다. LOC에서 진단을 할 경우, 오염에 의한 진단 오류를 최대한 줄일 수 있으며, 전문적 기술이 요구되는 작업을 칩 내에서 수행함으로써 작업 공정의 최소화 에 의한 편리성을 추구 할 수 있는 이점이 있다 [11].

이러한 LOC 기술은 DNA 및 RNA를 이용한 검측 방법에 필요한 유전자 추출, 농축, 정제, 증폭, 측정 등 일련의 과정을 효과적으로 집적화하고 자동화 할 수 있기 때문에 유전자 측정 방법이 직접적으로 적용될 수 있다.

이러한, LOC 기술을 이용하여 환경시료의 박테리아 및 바이러스를 측정하기 위해서는 대용량의 환경시료를 농축하는 공정이 필수적으로 수반되어야 한다. 또한 식중독 균과 같은 감염성 병원균은 매우 낮은 농도를 측정해야 하기 때문에, 마이크로 칩을 이용한 고효율의 농축 기술이 필요하다 [12].

그러므로 본 연구에서는 마이크로 칩에 적용할 수 있는 농축기술을 개발하고자 한다. 하지만 농축기술을 마이크로 칩에 적용하기 위해서는 원심력을 이용한 세척기능을 사용할 수 없기 때문에 생물반응의 저해물질로 알려진 카오트로픽 (chaotropic) 이온을 이용하는 Boom tech의 기술은 적용할 수 없다.

그러므로 본 연구에서는 용액의 pH를 이용하여 실리카 표면의 극성을 조절하는 방법으로 RNA를 농축시키는 방법을 이용한다. 고분자 칩에 실리카 표면을 부여하기 위하여 유리 비드를 고분자 칩내에 도입하였다. 유리 비드에 흡착되는 RNA 양은 용액의 pH 및 도입된 유리 비드의 양에 따라 조사되었고, 용액 유입속도에 따른 흡착률 또한 조사되었다.

농축된 RNA는 증폭의 과정을 거쳐 인식이 가능한 결과로 도출되었다. RNA 증폭 방법은 여러가지 방법이 있지만 그 중 RNA 항온 증폭 기술인 NASBA를 이용하였다 [13,14]. 이러한 항온 증폭 방법은 PCR과 달리 복잡한 열제어장치 (Thermo controller)가 필요 없어 LOC 적용에 유리하다.

본 연구는 RNA 농축 과정을 위한 유리 비드를 삽입한 고분자 칩과 NASBA 반응을 위한 고분자 칩을 연결하여 연속적인 공정을 유도하였으며 빠르고 정확한 진단 방법을 개발하여 편리성과 정확성을 요구하는 상업적 제품으로써의 완성도를 높였다.

재료 및 방법

재료

E. coli O157:H7 (ATCC 43895)은 American Type Culture Collection (Washington DC, USA)에서 구입하였다. RNA는 Total RNA Isolation NucleoSpin[®] RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany)를 이용하여 준비하였고, NASBA 증폭은 NucliSens[®] Basic Kit (Biomérieux,

France)가 사용하여 수행되었다. RNA 농축양의 측정은 iScript[™] cDNA Synthesis Kit와 iQ[™] SYBR[®] Green Supermix (BIO-RAD, USA)를 이용한 rt-PCR을 사용하였다.

Bovine Serum Albumin (BSA)와 버퍼 제작을 위한 Glycine, Acetate, Phosphate Buffer Saline (PBS), Tris-base 는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 칩 제작에 필요한 PDMS는 SYLGARD[®] 184 SILICONE ELASTOMER KIT (DOW CORNING, USA)를 사용하였으며, 슬라이드 글라스와 직경 100 μ m 유리 비드는 대한 과학에서 구입하였다.

프라이머

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)과 DNA star's primer 선택 소프트웨어를 사용하여 이론상 프라이머와 자가 다이머 실험, 쌍 다이머, 그리고 hairpin들을 최소화함으로써 민감성과 정확성을 최대화하였다. 측정 RNA 는 heat shock 단백질 clpB 유전자로 Gene Data Bank 에서 AE000345에서 gi1788939 : c11535-8962로부터 선택 되어졌다.

NASBA에 사용되는 프라이머 BM1 (5'-aattctaatacagact cactataggg-AAGGTTACTGGACGGCGACAA-3')는 4-nt GA-rich 배열순서에 의해 따라지는 5' end (lowercase)에서 T7 프로모터 유전자를 도입하였다. 프라이머 BM2는 다음 배열 순서는 5'-AAATCCACATTTCTGACGA-3'이다 [15].

real-time PCR (실시간 유전자 증폭장치)에 사용되는 프라이머는 gapA F (5'-ACTTCGACAAATATGCTGGC -3')와 gapA R (5'-CGGGATGATGTTCTGGGAA-3')이다 (Table 1) [16].

Table 1. Primer pairs used in real-time PCR and NASBA [15,16]

	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
Real-time PCR		
gapA F	ACTTCGACAAATATGCTGGC	54.1
gapA R	CGGGATGATGTTCTGGGAA	56.6
NASBA		
BM1	aattctaatacagactcactatagggAAGGTTACTGGACGGCGACAA	69.7
BM2	AAATCCACATTTCTGACGA	48.4

실험방법

칩 제작과 비드 삽입

1.5 cm x 1.5 cm의 정사각형으로 틀을 잡고 대각선의 방향으로 160 μ m x 80 μ m의 땀을 70 μ m의 간격으로 디자인하여 주형을 제작하고 PDMS를 이용하여 주형을 토대로 칩을 제작하였다. PDMS는 Sylgard 184 A와 DC-184 B를 10 : 1로 혼합하여 75°C에서 30분간 가열하였다. PDMS와

기판이 되는 슬라이드 글라스는 산소 플라즈마 장치를 이용하여 표면을 처리하여 부착하여 칩을 제작하였다.

PDMS 표면에 대한 RNA 농축에 대한 영향을 최소화하기 위하여 0.5% BSA 용액을 삽입하여 30분간 상온에서 방치 후 충분한 양의 DI water로 세척하였다.

RNA 농축 칩은 유리 비드를 사용하여 농축에 필요한 표면적을 높였다. 직경 100 μm 의 유리 비드는 튜빙 펌프를 이용하여 주입하였으며 칩 내의 대각선에 위치한 댐으로 유리 비드의 이탈을 방지하였다. NASBA를 위한 칩은 농축 칩과 그 형태는 같으나 유리 비드를 삽입하지 않은 칩을 사용하여, 농축 칩과 NASBA 칩을 연결 함으로서 RNA 시료 농축에서 반응까지 진단에 필요한 공정을 수행 가능한 칩을 제작하였다. Fig. 1은 완성된 칩의 형태를 보여준다.

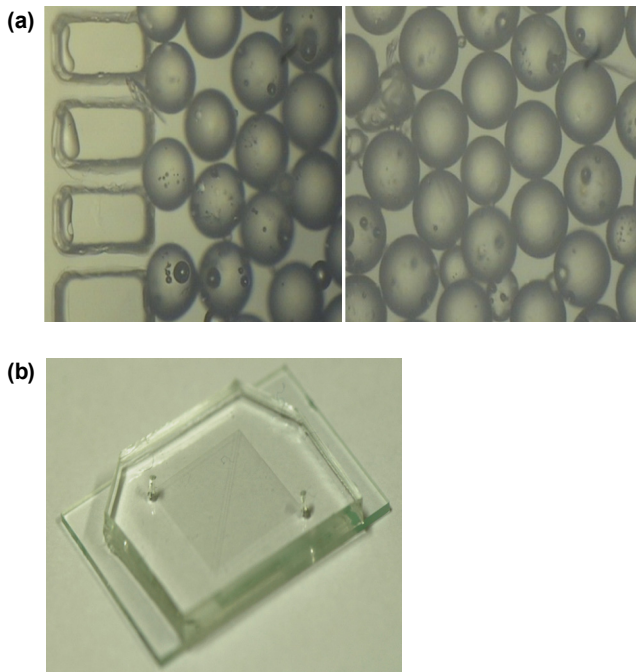


Fig. 1. Microscopic images of 100 μm beads and polymer micro chip; (a) 100 μm beads in the chip (b) PDMS micro chip (1.5 cm x 1.5 cm).

열 충격 절차와 환경샘플의 제작

E. coli O157:H7은 37°C에서 TSB 용액으로 배양했다. 대장균 속 열 충격 mRNA 생성을 촉진시키기 위해 세포들은 온도 변환기에서 50°C에서 10분 동안 가열하였다. 세포들은 핵산 방출을 최적화하기 위해 몇 가지 방법을 사용하여 세포를 분쇄하였다. ① 온도 변환기를 사용하여 10분 동안 95°C에서 가열하였다. ② 초음파기 (sonicator)를 사용하여 pulse on 3초, pulse off 2초, 총 시간 9초 동안 시행하였다. ③ Total RNA Isolation Kit에 포함된 세포 파괴 버퍼에 β -mercaptoethanol을 첨가하여 세포를 분쇄하였다.

분쇄된 *E. coli* O157:H7은 10^1 c.f.u/mL의 저농도로 희석하여 10 mL의 물에 첨가하여 환경샘플을 제작하였다.

RNA 농축 실험 및 real-time PCR

농축실험에서는 DNA 또는 기타 단백질에 의해서 유리 비드 흡착에 대한 RNA 농축률의 영향을 줄이기 위해 정제된 RNA를 사용하였다. 위의 방법으로 파괴된 10^5 c.f.u/mL의 *E. coli* O157:H7는 Total RNA Isolation NucleoSpin® RNA II kit에 명시된 방법에 따라 RNA를 정제하였다. 정제된 RNA 용액 200 μL 은 각각 다른 pH의 버퍼, glycine 버퍼 (pH 3, 50 mM), acetate 버퍼 (pH 5, 50 mM), phosphate 버퍼 (pH 7, 50 mM), Tris-HCl 버퍼 (pH 9, 50 mM) 200 μL 씩 혼합하였다. 유리 비드는 각각 0.3 g, 0.1 g, 0.05 g씩 튜브에 담고 각각의 다른 pH의 RNA 용액을 넣고 2000 rpm에서 1분간 흔들여 준 후 유리 비드가 가라앉도록 30초간 둔 후 상층액은 따로 분리하였다.

상층액은 각 pH 별 흡착량을 알기 위해, 먼저 cDNA로 합성한 후 실시간 유전자 증폭 (real-time PCR)을 시행하였다. iScript™ cDNA Synthesis Kit에 명시된 방법에 따라 cDNA를 합성하였으며, 합성된 cDNA를 주형으로 rt-PCR을 수행하였다. iQ™ SYBR® Green Supermix kit의 용액은 10 μL 을 사용하였고 프라이머 gapA F, gapA R는 2.5 μM 의 농도를 사용하였으며 PCR 용액은 20 μL 가 되도록 하였다.

칩 내에서의 RNA 흡착과 탈착

제작된 칩 내에 유리 비드를 일정량 삽입하고 세포 분쇄 용액을 buffer (pH 3, 5, 7, 9)와 혼합한 후, 펌프를 이용하여 2 mL/min의 속도로 통과시켰다. 흡착에 대한 영향은 칩에 통과시키기 전 용액과 칩을 통과하고 나온 용액을 rt-PCR을 이용하여 유리 비드에 mRNA가 흡착된 정도를 측정하였다.

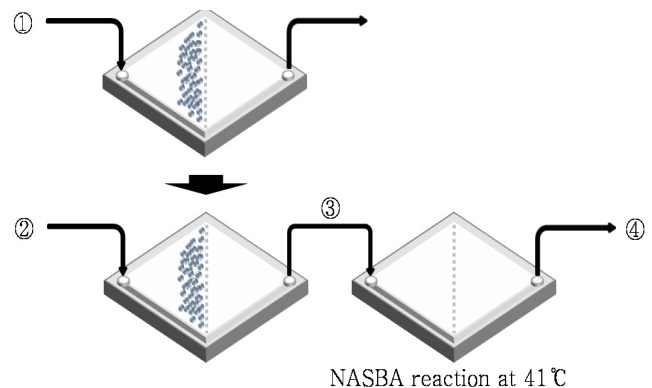


Fig. 2. Scheme of mRNA concentration and amplification using polymer micro chip ① Sample loading containing *E. coli* O157:H7 with binding buffer (Acetate, pH 5), ② Loading of Elution buffer (Tris-HCl, pH 9, 20 μL), ③ Transfer of elution buffer containing concentrated mRNA to amplification micro chip, ④ Measure of amplified product.

또한 RNA 탈착을 위하여 acetate 버퍼에서 유리 비드에 mRNA를 흡착 시킨 후 20 μ L의 Tris-HCl 버퍼 (pH 9)을 칩 내부에 삽입하고 5분간 상온에 방치하였다. 칩에 통과시키기 전 용액과 Tris-HCl 버퍼에 포함된 mRNA를 rt-PCR을 이용하여 비교함으로써 탈착에 대한 영향을 측정하였다 (Fig. 2).

농축된 mRNA의 Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) 증폭

PDMS 칩 안에 BSA 용액을 삽입하고 PDMS 표면에 충분한 흡착을 위하여 30분간 상온에 방치한 후, 충분한 양의 DI water를 펌프를 이용하여 칩 내에 흘려 줌으로써 칩 내부를 세척하였다. 농축된 mRNA를 삽입한 후 NucliSens[®] Basic Kit에 포함된 프로토콜과 시약들을 사용하여 증폭을 시도하였다. 70 또는 90 mM KCL, 각 프라이머 0.2 μ M, 5 μ L의 샘플 그리고 5 μ L의 효소 혼합 용액 (RNase H, T7 polymerase, 그리고 AMV-RT)까지 총 20 μ L의 용량이 사용된다. 효소 혼합 용액을 사용하기 전에 BM1과 BM2 프라이머는 5분동안 65 $^{\circ}$ C까지 가열하고 41 $^{\circ}$ C까지 온도를 낮춘다. 효소 혼합 용액을 첨가하고 증폭 시료인 mRNA가 기하급수적으로 증폭할 수 있도록 90분 동안 41 $^{\circ}$ C로 유지한다. 증폭된 산물은 전기영동을 통해서 직접 확인한다.

결과 및 고찰

RNA와 유리 비드의 흡착에 대한 pH 영향

유리 비드는 표면에 돌출된 히드록시기 (-OH)를 가지며 [17,18] 이것은 RNA의 phosphate기와 결합함으로써 RNA의 흡착이 이루어진다. 히드록시기는 용액 중 수소이온농도 (pH)에 영향을 받는데, 수소이온농도가 낮아지면 수소이온을 해리하여 산소이온 형태가 되므로 음극을 띄게 되고, 수소이온농도가 높아지면 용액 중의 수소이온과 표면의 산소이온이 반응하여 극성이 없어지게 된다. 그러므로 RNA의 phosphate기는 음극을 띄고 있으므로 수소이온농도가 높을 때 정전기적 인력에 의한 repulsion 힘이 없어져 RNA 흡착이 가능하다. 그러므로 인위적으로 수소이온농도를 조정한 버퍼를 이용하여 유리 비드와 RNA의 흡착을 유도하여 알맞은 수소이온농도를 결정한다. Fig. 3은 수소이온농도에 따른 유리 비드와 RNA의 흡착률을 그래프를 통하여 보여준다. 0.05 g의 유리 비드는 pH 5의 버퍼에서 약 70%의 농축률을 보인다. 수소이온농도가 낮아질수록 농축률은 내려간다. 이는 유리 비드 표면의 수소이온이 해리되면서 음극을 띄어 같은 음극의 phosphate기를 갖는 RNA의 흡착을 용이하지 않게 하기 때문이다. 그러나 예상과는 달리 pH 3의 버퍼에서는 약 45%의 낮은 농축률을 보였

다. 이것은 PCR 용액 중 효소 단백질의 최적 활동 수소이온농도를 유지하기 위해 pH 8의 버퍼가 첨가되어 있는데 낮은 pH의 버퍼에 의해 흡착된 RNA가 PCR에 의해 증폭될 때 서로 상반된 pH를 가진 버퍼가 혼합되면서 PCR을 저해시켰을 가능성이 있다고 판단한다. 또는 DNA에 비해 안정성이 매우 약한 RNA가 강한 산도에서 손상을 입었을 가능성도 배제할 수 없다. Fig. 3(b)에 따르면 유리 비드의 양이 증가할수록 RNA 농축률은 더 이상 pH의 변화에 크게 영향을 받지 않으면서 높은 농축률을 보인다. 이것은 흡착할 RNA의 양보다 유리 비드의 표면적이 월등히 커서 0.05 g의 유리 비드의 경우 낮은 pH가 아니면 RNA가 흡착하기에 부족했던 표면적이 매우 풍부하여 낮은 pH의 효과 없이 RNA 흡착에 좋은 성과를 거두고 있음을 의미한다. 그럼에도 불구하고 위와 동등한 이유로 여전히 pH 3의 버퍼에서는 PCR의 효율이 조금 떨어지는 것으로 보인다.

유리 비드의 양에 대하여 유리 비드의 양이 증가할 경우, 넓은 표면적으로 인하여 pH 7의 버퍼에서도 높은 RNA 흡착율을 보이지만, 비드의 양이 적을 경우는 여전히 pH 5의 버퍼에서 최고의 농축률을 보였다. 적은 유리비드를 사용하는 것은 시료가 상대적으로 낮은 압력강하를 가지고 이동할 수 있다는 장점이 있으므로, 적은 유리 비드 양을 이용하여 RNA를 흡착하기 하여 RNA 농축 시스템의 최적 조건으로 수소이온농도를 pH 5로 결정하였다.

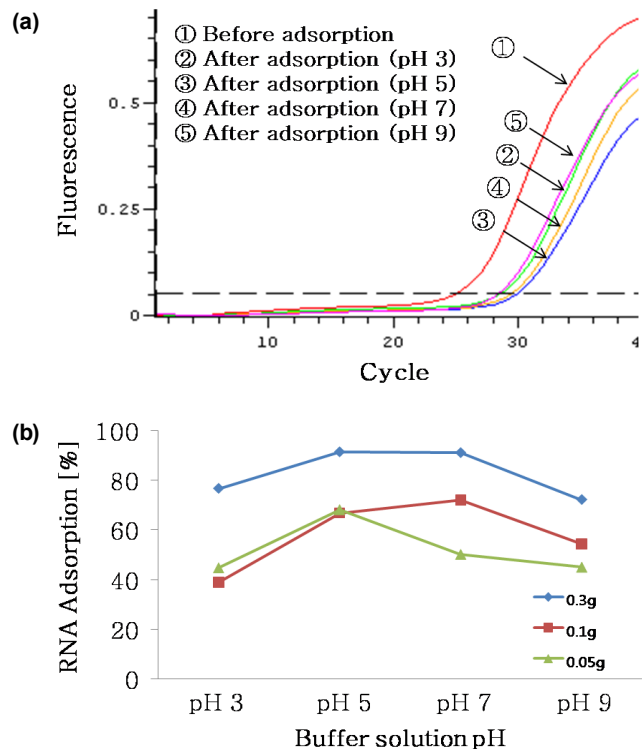


Fig. 3. Adsorption rate of RNA on 100 μ m beads in the tube (a) real time PCR result using 0.3 g beads with various pH, (b) The effect of amount of glass beads on RNA adsorption at various pH.

시료 주입 속도에 따른 흡착률 변화

칩 내부에 유리 비드를 삽입하고 시료를 주입할 시 내부 압력은 다소 증가하지만 칩의 파열 없이 5 mL/min의 속도 까지 견딜 수 있도록 고안되어 있다. 그러나 mRNA가 유리 비드 표면에 흡착될 때 흡착 반응에 필요한 시간이 과연 5 mL/min의 속도에서도 충분한지는 의문이다. 또한 흡착 반응시간을 위해 시료 주입 속도를 감소시키면 대용량의 시료를 농축하기에는 시간적 효율이 떨어지게 된다. 그러므로 시료 주입 속도를 조절하여 주입속도가 농축률에 대해서 직접적으로 영향을 보이는 속도 지점을 찾았다.

유리 비드 0.005 g을 고정시키고 펌프를 이용하여 시료 주입속도에 변화를 주었다 (Fig. 4). 1-2 mL/min의 경우 농축률에서 큰 변화가 보이지는 않았으나, 3 mL/min부터 농축률이 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 그러므로 시료 주입 속도를 2 mL/min으로 결정하였다.

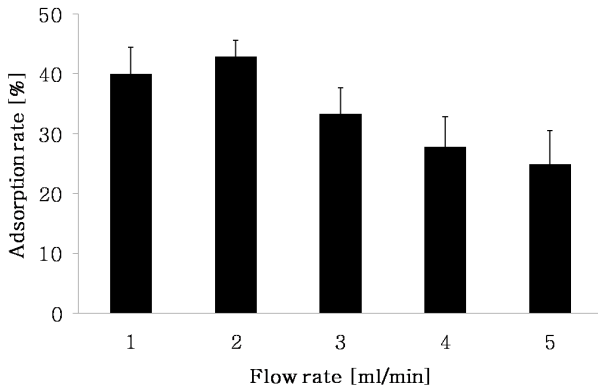


Fig. 4. The effect of feed flow rate on RNA adsorption using micro chip.

유리 비드의 양에 따른 흡착률 변화

칩 내부의 부피는 20 μ L로 농축을 위해 많은 양의 유리 비드가 도입되는 것은 무리가 있다. 그러므로 되도록 적은 양의 유리 비드로 가능한 높은 농축률을 보여야 한다 (Fig. 5).

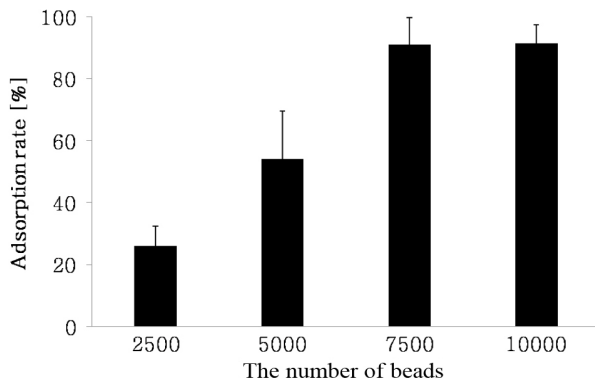


Fig. 5. The effect of bead amount on RNA adsorption using micro chip.

따라서 칩 내부에 각각 2,500개, 5,000개, 7,500개, 10,000개의 비드를 삽입하고 파괴된 저농도인 10^3 c.f.u의 *E.coli* O157:H7 시료 100 mL를 통과시킴으로 흡착률을 측정하였다. 유리 비드의 개수가 많을수록 RNA 농축률은 높아졌다. 2,500개의 유리 비드를 삽입한 경우 흡착률이 특별히 낮은 이유는 표면적이 감소할 뿐만 아니라, RNA와 비드의 충돌 시간도 동시에 감소하였기 때문이라고 판단된다.

유리 비드의 양에 따른 mRNA 탈착률 변화

대용량의 시료에서 저농도의 mRNA를 농축할 때 유리 비드에 mRNA의 흡착률은 매우 중요하게 작용한다. 그러나 농축된 mRNA를 NASBA로 증폭하고자 할 때 유리 비드로부터 mRNA가 탈착되어야 하기 때문에 흡착된 mRNA의 탈착 또한 매우 중요한 문제이다.

높은 pH의 수용액 상에서 유리 비드 표면의 히드록시기는 수소이온을 해리하여 음극을 띄게 된다. mRNA의 phosphate 기는 음극을 띄고 있으므로 정전기적 반발력에 의해 유리 비드에 흡착되어 있던 mRNA가 유리 비드로부터 방출되게 된다.

Fig. 6에서 유리 비드에 흡착되어 있던 mRNA가 pH 9의 버퍼에 의해서 탈착되는 정도를 보여주고 있다. Recovery rate (%)는 초기에 도입된 mRNA의 양을 기준으로 흡착/탈착 단계를 거친 후, 획득한 양을 나타낸다. 그림 5와 비교했을 시, 흡착된 대부분의 mRNA가 탈착되는 것을 알 수 있었다. pH 9에서 5분간 incubation 했을 때, 쉽게 탈착이 되는 것으로 보아, Fig. 3에서 제시된 결과에서 pH9에서도 30% 이상의 mRNA가 흡착되는 현상은 표면과 수소결합에 의한 것이 아니라, 넓은 표면적에 의한 비특이적 결합으로 생각된다. 그 이유는 표면적이 증가할수록 버퍼의 pH에 따른 영향이 감소하고, 표면적이 감소하면 pH의 영향이 도출되는 현상으로 판단할 수 있다.

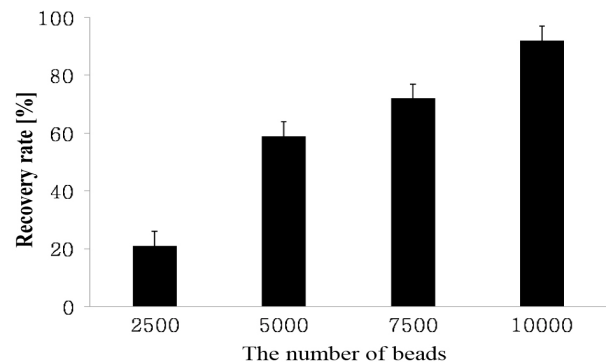


Fig. 6. The effect of bead amount on RNA desorption using micro chip.

BSA 농도 최적화와 대용량 저농도의 환경 샘플 실험

챔버를 이용한 RNA 농축 및 증폭 시스템은 제작된

PDMS 칩 내에서 이루어진다. 그러나 PDMS는 단백질과의 결합이 매우 용이하여 RNA 뿐만 아니라 NASBA 반응에 필요한 효소 단백질도 쉽게 결합되어 NASBA 반응에 어려움이 있다. 따라서 PDMS와 단백질의 결합을 막기 위해 다른 단백질에 의한 블로킹 (blocking) 작업이 필요하다. 그러나 너무 높은 농도의 단백질은 오히려 NASBA 용액 내의 효소 단백질 농도 영향을 주어 NASBA 반응에 저해제로 작용하거나 혹은 너무 낮은 농도의 단백질은 PDMS 칩 내부를 충분히 블로킹 할 수 없으므로 BSA (Bovine Serum Albumin)를 이용하여 최적 농도조건을 결정하는 실험을 수행하였다. Fig. 7은 BSA의 최적농도 결정 실험 결과를 보여주고 있다. 농축 칩과 연결된 PDMS 칩에 0.5%와 5%의 BSA 처리를 하고 준비된 NASBA 용액과 함께 농축 칩에서 유리 비드에 농축된 mRNA를 pH 9 버퍼로 탈착시킨 용액을 주입하여 NASBA를 수행하였다. 그 결과 BSA 처리를 하지 않은 PDMS 칩은 NASBA 반응을 하지 못하였고, 5%의 고농도 BSA를 첨가한 PDMS 칩 또한 5번, 6번 레인에서는 반응이 되지 못하였으므로 성공적인 NASBA 반응이라고 할 수 없다. 0.5%의 BSA를 첨가한 PDMS 칩만이 NASBA 반응을 성공적으로 진행할 수 있었다. 따라서 0.5%의 BSA를 PDMS 칩 내부의 블로킹을 위한 최적의 농도로 결정하였다.

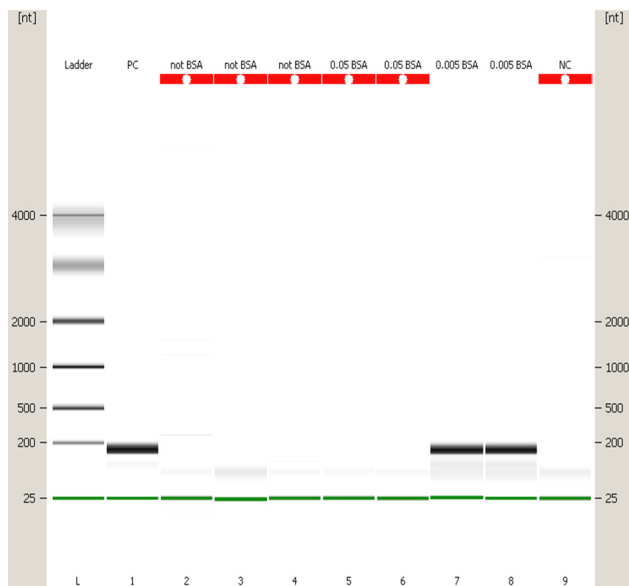


Fig. 7. Effect of BSA concentration on NASBA reaction (sample concentration: 1 c.f.u/1 mL, 10 mL) in micro chip, 1 is for Positive Control; 2, 3, and 4 are for NASBA product without BSA 5 and 6 are for NASBA product with 5% BSA; 7 and 8 are for NASBA product with 0.5% BSA; 9 is for Negative Control.

이 실험에서는 10^1 c.f.u의 *E.coli* O157:H7이 포함된 10 mL를 사용하였다. 이렇게 낮은 농도의 시료를 이용한 이유는 환경시료에 존재하는 극 저농도의 시료를 검출할 수 있어

야 하기 때문이다.

그러므로 본 연구를 통하여 환경시료내 박테리아를 10^1 c.f.u/10 mL의 극 저농도까지 검출이 가능함을 알 수 있었다.

요 약

본 연구는 환경샘플 중 병원균을 진단하기 위한 목적을 가진다. 최소 챔버 칩에서 환경 샘플 중 병원균을 농축하고 mRNA를 증폭하여 효과적이고 간단한 진단방법을 고안하였다. PDMS로 면적 1.5 cm x 1.5 cm, 높이 100 μ L의 칩을 제작하여 유리에 부착시켰다. RNase에 의한 진단 오류 또는 실패를 막고자 RNase away 처리를 하고, RNA와 PDMS의 결합을 막기 위해 BSA 처리를 하였다. 수질에 있는 병원균은 매우 적은 농도로 존재하므로 농축의 과정이 필요하다. 농축의 방법에는 여러 가지가 있으나 본 연구에서는 유리 비드를 칩 내에 삽입하고 저농도의 시료를 주입함으로써 고농도로 농축을 하는 방법을 사용하였다. 그러나 부피가 작은 칩 내에서 수행하기에는 내부 압력이 작용하여 문제가 발생하여 100 μ m의 유리 비드를 사용하고 유리 비드의 칩 내부 이탈을 방지하기 위하여 댐을 만들어 농축에 가장 적합한 칩의 형태를 잡았다. 시료의 주입속도에 따라 내부 압력이 상승하여 댐의 기능이 상실하여 유리 비드가 이탈하게 되므로 그것을 방지하기 위하여 칩 내에 댐을 강화하여 만들고 내부압력 증가가 방지되는 최적의 댐을 개발하여 시료의 주입 속도 5 mL/min까지 유리 비드의 이탈을 막았다. 유리 비드에서의 RNA 농축은 pH 5에서 효과적이고 pH가 증가할수록 유리 비드와 RNA의 결합이 끊어지는 현상을 보였으므로 시료에 pH 5의 버퍼를 첨가하여 농축을 진행하고 중성의 NASBA 용액을 주입하여 유리 비드에서 탈착된 농축된 고농도의 RNA를 증폭하였다. NASBA는 항온 수조에서 온도에 변화 없이 41°C에서 1시간 30분 동안 진행하며 증폭된 mRNA는 직접 확인하였다.

이 방법은 LOC 기술을 적용하여 저농도의 시료를 효과적으로 측정할 수 있도록 편리한 바이오 칩을 개발함으로써 대용량의 샘플 중 극 저농도의 대장균을 효과적으로 검출할 수 있는 장점을 가지고 있다.

감 사

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia21 project), 교육인적자원부의 2007년도 학술진흥재단 (KRF-2007-D00099) 및 2007년도 경원대학교의 지원에 의한 결과임.

접수 : 2009년 6월 18일, 게재승인 : 2009년 10월 14일

REFERENCES

1. Gauthier, F. and F. Archibald (2001) The ecology of "faecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. *Water Res.* 35: 2207-2218.
2. Yang, L. and R. Bashir (2008) Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology and Advances* 26: 135-150.
3. Hu, Y., Q. Zhang, and J. C. Meizer (1999) Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157 : H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 87: 867-876.
4. Cho, Y. K., J. T. Kim, Y. S. Lee, Y. A. Kim, K. Namkoong, H. K. Lim, K. W. Oh, S. H. Kim, J. I. Han, C. S. Park, Y. E. Pak, C. S. Ki, J. R. Choi, H. K. Myeong, and C. Ko (2006) Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 2161-2169.
5. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715.
6. Jeffrey, W. H., S. Nazaret, and R. Von Haven (1994) Improved method for recovery of mRNA from aquatic samples and its application to detection of *mer* expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1814-1820.
7. Sheridan, G. E. C., C. I. Masters, J. A. Shallcross, and B. M. Mackey (1998) Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1313-1318.
8. Van der Vliet, G. M. E., R. A. F. Schukink, B. Van Gemen, and P. R. Klatser (1994) Assessment of mycobacterial biability by RNA amplification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1959-1965.
9. Sela, M., C. B. Anfinsen, and W. F. Harrington (1957) The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochem. Biochem. Acta.* 26: 502.
10. Anfinsen, C. B., E. Haber, M. Sela, and F. H. White, Jr. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Biochemistry* 47: 1309-1314.
11. Kim, J. A., J. Y. Lee, S. Y. Seong, S. H. Cha, S. H. Lee, J. J. Kim, and T. H. Park (2006) Fabrication and characterization of a PDMS-glass hybrid continuous-flow PCR chip. *Biochemical Engineering Journal* 29: 91-97.
12. Hwang K. Y., H. K. Lim, S. Y. Jung, K. Namkoong, J. H. Kim, N. Huh, C. Ko, and J. C. Park (2008) Bacterial DNA sample preparation from whole blood using surface-modified Si pillar arrays. *Anal. Chem.* 80: 7786-7791.
13. Baeumner, A. J., M. C. Humiston, R. A. Montagna, and R. A. Durst (2001) Detection of viable oocysts of *Cryptosporidium parvum* following nucleic acid sequence based amplification. *Anal. Chem.* 73: 1176-1180.
14. Simpkins, S. A., A. B. Chem, J. Hays, B. Popping, and N. Cook (2000) An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enteric.* *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 75-79.
15. Min, J. H. and A. J. Baeumner (2002) Highly sensitive and specific detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Analytical Biochemistry* 303: 186-193.
16. Fitzmaurice, J., M. Glennon, G. Duffy, J. J. Sheridan, and C. Carroll, M. Maher (2004) Application of real-time PCR and RT-PCR assays for the detection and quantitation of VT 1 and VT 2 toxin genes in *E.coli* O157 : H7. *Molecular and Cellular Probes* 18: 123-132.
17. Zhuravlev, L. T. (1987) Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir* 3: 316-318.
18. Jiang, Z. X., L. H. Meng, Y. D. Huang, L. Liu, and C. Lu (2007) Influence of coupling agent chain lengths on interfacial performances of polyarylacetylene resin and silica glass composites. *Applied Surface Science* 253: 4338-4343.