

상피세포 시료 전처리용 마이크로바이오칩에 관한 연구

하승모* · 조 응* · 안유민*† · 황승용**

* 한양대학교 기계공학과, ** 한양대학교 분자생명과학부

Study on Microbiochip for Buccal Cell Lysis and DNA Purification

Seung-Mo Ha*, Woong Cho*, Yoomin Ahn*† and Seung Yong Hwang**

*Dept. of Mechanical Engineering, Hanyang Univ.,

**Division of Molecular and Life Science, Hanyang Univ.

(Received July 13, 2009 ; Revised October 6, 2010 ; Accepted October 10, 2010)

Key Words: Microbiochip(초소형 바이오칩), Sample Preparation(시료전처리), Cell Lysis(세포분쇄), DNA Purification(DNA 정제)

초록: 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하려면 세포 용해(cell lysis)와 DNA추출(DNA purification)과정이 포함된 시료 전처리 과정을 거쳐야 한다. 종래의 시료 전처리 과정은 계면활성제와 같은 세포용해 버퍼를 이용하거나 열 또는 전기적 방법으로 세포막 파열을 유도하여 세포벽을 깬 후에 잔여물 처리과정을 거쳐 DNA를 추출하게 된다. 본 연구에서는 마이크로 비드와 PDMS 기등을 이용한 필터가 있는 시료 전처리용 바이오칩을 설계 및 제작하였다. 또한 제작된 바이오칩을 사용하여 80℃에서 2분간 세포용해를 수행하고 DNA를 추출하였다. 칩에서 전처리과정을 거친 시료내의 DNA농도와 순도를 측정하고 DNA PCR과 겔 전기영동을 통해 시료 전처리용 바이오칩의 성능을 평가하였다.

Abstract: This paper describes a separable microfluidic device fabricated with PDMS (polydimethylsiloxane) and glass. The device is used for sample preparation involving cell lysis and the DNA purification process. The cell lysis was performed for 2 min at 80°C in a serpentine-type microreactor (20 μl) using a Au microheater that was integrated with a thermal microsensor on a glass substrate. The DNA that was mixed with other residual products during the cell lysis process was then filtered through a new filtration system composed of microbeads (diameter: 50 μm) and PDMS pillars. Since the entire process (sample loading, cell lysis reaction, DNA purification, and sample extraction) was performed within 5 min in a microchip, we could reduce the sample preparation time in comparison with that for the conventional methods used in biochemistry laboratories. Finally, we verified the performance of the sample preparation chip by conducting PCR (polymerase chain reaction) analysis of the chip product.

1. 서 론

최근 화학적 또는 생화학적 분석장치로 있는 마이크로 종합 분석 시스템(micro total analysis system, μTAS)이 대두되고 있다. μTAS는 극소화된 화학분석 장치로 모든 필요한 분석 절차를 할 수 있는 장치를 한 개의 칩 위에 구현하는 것이 그 목표이다. 이에 대한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있는 데에는 아주 작은 양으로 많은 정보를 알아내야 하는 의료 및 생명과학 분야에서의 요구가 급증하고 있는데 기인한다. 예를 들면 피 한 방울로 적혈구, 백혈구, 혈당, 혈소판

등의 활동도와 종류를 모두 알아 낼 수 있는 간편한 장치가 개발된다면, 유용하게 쓰일 것이다. μTAS는 분석 비용과 시간, 에너지 소비량을 줄일 수 있고 환경오염도 최소화 할 수 있으며 분해 능력을 향상시킬 수 있는 이점이 있다. 하지만, 한 개의 칩 상에서 여러 가지 장치를 상호 연결하여 시료처리 능력을 향상시키는 데에는 아직 많은 연구가 필요한 실정이다. 아직 대부분의 경우에는 시료 전처리는 일반적인 실험실 방법으로 수행하고 그 결과물을 μTAS 칩에 주입하여, 그 이후의 분석과정들을 칩 상에서 수행하는 수준이다. 최근에는 시료 전처리 과정도 같은 칩 상에서 수행하고자 하는 연구가 진행되고 있다.⁽¹⁾ 유전자 분석에서는 시료전처리로서 세포에서

† Corresponding Author, ahnym@hanyang.ac.kr

© 2010 The Korean Society of Mechanical Engineers

DNA를 추출해 내는 것이 매우 중요하다. 추출된 DNA를 증합효소 연쇄반응(PCR) 과정을 거쳐 증폭시킨다면 아주 적은 양의 시료를 가지고도 많은 정보를 얻을 수 있기 때문이다. 이 과정이 바이오칩에서 이루어진다면 더 빠른 시간에 더 적은 양의 시료를 가지고 생화학적 분석이 가능해진다. 이에 바이오칩 상에서 세포로부터 DNA를 추출해 내는 방법이 많이 연구되고 있는 실정이다. 세포에서 DNA를 추출하기 위해서는 우선 간단한 세포벽을 깨고 그 안의 DNA를 골라내야 한다. 세포벽을 깨는 방법은 화학적, 전기적, 기계적 방법으로 나뉜다. 화학적 방법은 계면활성제와 같은 세포용해 버퍼를 이용하는 것이고, 전기적 방법은 전기장으로, 기계적 방법은 열에너지 등으로 세포막 파열을 유도 하는 것이다. 화학적 방법은 일반적으로 생화학 실험실에서 널리 쓰이는 방법으로 간단한 약품 주입으로 세포용해가 가능하지만 반응 후의 용해버퍼 이외의 여러 잔여물들(wastes)이 발생하여, 잔여물 처리 과정(wastes washing process)이 필요하여 μ TAS에 적용하기에 알맞지 않다.⁽²⁾ 전기적 방식은 μ TAS에 적용이 비교적 용이하나 1kV/cm 이상의 높은 전기장을 발생시켜야 만 세포가 분쇄된다.⁽³⁾ 세포가 포함되어 있는 시료에 열을 가하는 기계적 방법을 사용하면 세포용해 첨가제와 같은 화학 반응물이 간섭하지 않으므로 잔여물 처리과정 없이 다음 단계의 반응으로 바로 이어질 수 있는 장점이 있다. Ke 등⁽⁴⁾의 연구에서는 실리콘 칩에 마이크로 히터를 제작하여 94°C에서 세포를 용해하였다. 세포가 용해된 후에 순수 DNA를 추출해 내기 위한 방법으로 마이크로비드, 전기장, 기계적 필터를 이용한 방법 등이 소개되었다. 마이크로비드와 전기장을 이용한 방법은 DNA를 일시적으로 잡아 두었다가 DNA를 제외한 세포 내 잔여물들을 세척(washing)하는 방법으로 DNA를 추출해 낸다.⁽⁵⁾ 이 방법의 경우에도 잔여물 처리 과정이 필요하여 μ TAS 칩에 적용되기 어려운 점이 있거나 칩 제작이 복잡해지는 단점이 있다. 기계적 필터를 이용하는 방법은 MEMS 제작 기술인 광학적 사진식각을 이용하여 실리콘을 기반으로 하여 수 마이크로 단위의 기둥 망을 제작하는 것이다.^(6,7) 이 경우에는 실리콘을 이용하여 제작하였기 때문에 생화학적으로 안정하지 못하여 실리콘 표면에 표면처리를 해야 하고, 그 제작 공정이

복잡하고 제작비용이 높아 대량 생산에 적합하지 않다는 문제점이 있다.

본 연구에서는 기존의 기계적 세포 용해법들의 단점을 보완하여, μ TAS 칩에 적용이 용이하며 생화학적으로 안정된 칩을 개발하였다. 즉, 열에너지를 이용하여 세포를 용해하고, 제작법이 간편하여 대량생산이 용이한 친생화학적 재료인 PDMS로 만들어진 마이크로 기둥 망과 마이크로 비드를 이용하여 용해 물질로부터 DNA를 추출하는 시료 전처리용 마이크로 바이오칩을 설계 제작하였다.

2. 마이크로바이오칩 설계 및 제작

2.1 시료전처리 반응조

현재 바이오칩 상에서 시료를 정제하고 농축하는 것이 실험실 일반 장치에서 보다는 빠르고 시료소모도 적지만 여전히 시간이 많이 걸리고 그 과정이 복잡하여 바이오칩을 이용한 장점을 극대화 하지 못하고 있다. 본 연구에서는, 손쉽게 채취 가능한 구강 세포로부터 DNA를 추출하는 시료 전처리 과정을 바이오칩 상에서 구현해 보고자 한다. 저렴한 가격에 대량 생산이 가능한 PDMS로 반응조 칩을 만들고, 열전달 효율을 높이기 위해서 히터와 센서가 제작된 유리칩과 결합하여 사용하는 이중형 칩으로 설계하였다. Fig. 1은 DNA추출을 위한 바이오칩의 개념도를 나타낸다.

마이크로 스케일의 경우 유체의 유동이 거시적 세계와는 다른 양상을 보인다. 미시적 세계는 체적이 차지하는 비중이 표면적에 비해 월등히 작으므로 미세 채널의 표면 성질에 따라 유동 현상이 크게 좌우된다. PDMS의 경우는 O_2 plasma 처리를 한 후 48시간이 지나면 표면의 성질은 완전

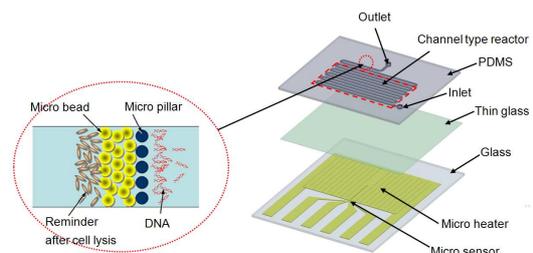


Fig. 1 Schematic of a detachable biochip fabricated with PDMS and glass for the sequential process of thermal cell lysis and mechanical DNA purification

한 소수성을 띠게 된다. 이는 챔버 형태를 갖는 반응조에 액체 시료의 주입 시 기포 발생을 야기시킬 수 있고 이 기포의 생성으로 인해 유체의 원활한 흐름이 방해받거나 생화학 반응 시 방해요인으로 작용하기도 한다. 그래서 PDMS표면에 BSA, PVP와 같은 화학약품으로 친수성 처리를 하여 공기기포 발생을 억제하기도 한다.^(8,9) 하지만 이런 친수성 처리 방법은 시간이 지나면서 성능이 떨어지거나 화학약품의 첨가로 생화학 반응에 적합하지 않을 수 있다. 또 다른 방법으로는 챔버 형태의 반응조 구조 대신 채널 형태의 반응조 구조를 이용하는 것이다.⁽¹⁰⁾ PDMS 재료의 소수성을 해결하기 위해서 이 논문에서도 세포분쇄용 반응조를 채널 형태로 설계하였다. 채널의 높이와 폭은 각각 150 μm , 600 μm 이고, 반응채널 내 시료의 총 용량은 20 μl 이다. 시린지에 의해 칩으로 시료가 주입될 수 있도록, 채널 아래쪽에 직경 1mm 크기의 주입구 부위를 만들었다. 주입된 시료는 채널 아래쪽에 위치한 마이크로 히터에 의해 일정 온도로 가열되어 세포분쇄 반응이 수행된다.

세포분쇄 반응이 끝나면 채널 내에는 세포가 분쇄되면서 나온 DNA를 포함한 여러 세포 구성물들이 존재하게 된다. 이 여러 잔여물들 중에서 DNA를 추출하는 방법에는 여러 방법들이 사용된다. 일반적으로 실험실에서는 DNA를 추출하기 위하여 원심분리기를 이용하는 방법을 쓴다. 바이오칩 내부에서 DNA를 추출하기 위해서는, 채널 내에 댐구조를 만들어 필터링시키는 방법이나 마그네틱 비드를 이용하여 DNA를 흡착시켜서 잔여물로부터 분리하고 비드에 흡착된 DNA를 채널 내에 전자기력을 이용하여 고정시켰다가 잔여물을 세척(washing)한 후에 다시 DNA를 마그네틱 비드에서 분리하여 DNA를 추출하는 방법이 쓰인다. 하지만 구조적으로 필터 댐을 만드는 방법은 댐 사이즈가 수 마이크로미터 크기로 형성되어야 하기 때문에 실리콘 재료에 비해 PDMS 재료로 구현하기 어렵다. 또한 마그네틱 비드에 DNA를 흡착시켜다 분리하는 방법은 제작 방법과 DNA추출 과정이 복잡하고 잔여물의 처리 방법에 있어 μTAS 칩에 적용하는데 한계가 있다. 이러한 이유로 μTAS 칩에서는 좀 더 간단한 방식의 DNA추출 방법이 요구된다.

본 논문에서는 PDMS가 갖는 재료적 특성을

고려하여 Fig. 2와 같이 수십 마이크로미터 크기의 기둥들을 채널 내에 형성하고 기둥 앞에 마이크로 비드들을 채워 넣어, 비드 틈새를 통해 DNA를 정제할 수 방법을 고안하였다. 즉, 상대적으로 크기가 큰 잔여물들이 마이크로 비드에 의해 걸러지고 DNA만이 칩 배출구로 추출되게 된다. 마이크로 비드의 직경이 50 μm 로 균일하고 채널 내에 빼곡히 차 있다고 가정하면 비드 사이를 통과할 수 있는 구형태 물질의 최대 직경이 대략 7.7 μm 이다. DNA의 크기는 bp로 정의되는데 1bp의 크기는 약 0.34nm이다. 일반적으로 DNA의 크기는 1000bp (1 μm)를 넘지 않는다. 따라서 DNA들은 모두 통과 된다고 볼 수 있고, 일반적으로 그 보다 크기가 큰 다른 잔여물들이 걸러지게 된다. 본 연구에서는 직경이 50 μm 에서 80 μm 의 분포를 가지는 마이크로 비드(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. PDMS 기둥의 간격이 50 μm 보다 좁을 경우에는 필터 부분에 배압이 발생하여 시료 주입이 어렵거나 마이크로 비드가 채널내에 적층되어 있기 때문에 과도한 필터링 효과가 발생할 수 있다. 따라서 채널 내 PDMS 기둥사이의 간격은 50 μm 로 설계하였으며 기둥의 직경은 100 μm 로 정하였다.

2.2 마이크로 히터 및 온도센서

세포분쇄를 수행하기 위하여 본 시스템에서는 열에너지를 이용하였다. 세포분쇄 반응은 마이크로 히터에서 전달된 열에너지에 의해 일정한 고온에서 세포용해가 이루어진다. 원활한 세포의 용해를 위해서는 반응에 필요한 정확한 온도로 시료를 가열해야 한다. 본 연구에서는 유리관 위에 금속 박막을 증착하여 박막형 저항체를 히터와 온도센서로 이용하였다. 히터에서 발생한

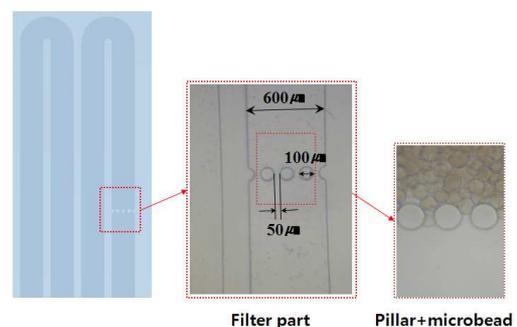


Fig. 2 Pillars and microbeads in PDMS channel for DNA filtration

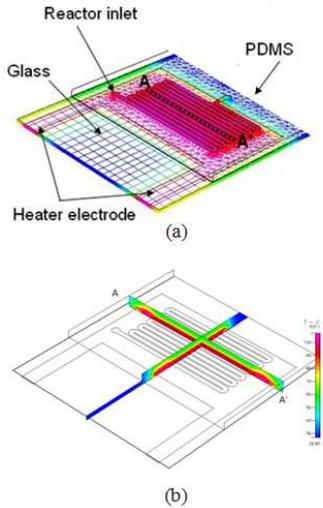


Fig. 3 (a) Schematic of integrated microbiochip and (b) simulated thermal profile of chip inner surface after 2sec

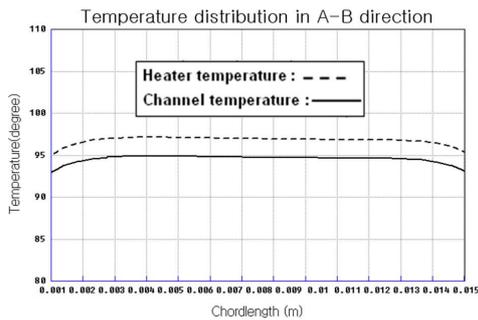


Fig. 4 Temperature distribution of chip inner surface

열이 시료에 전달되는 양상으로 열전달 효율을 예측해 보기 위하여 Fig. 3과 같이 CFD-ACE+ 해석 프로그램으로 열전달 해석을 수행하였다.

해석 조건으로, 시료는 탈이온수 (deionized water)로 가정하였고 탈이온수, PDMS, 유리기판 및 덮개 유리의 열전도율은 각각 0.613, 0.17, 1.13 W/m-K로 가정하였다. 열전달 해석을 위해, 마이크로 히터에서 벽열원 (wall heat source) 형태의 100000 W/m² 열에너지가 발생되며 초기 온도는 실온 20℃인 것으로 가정하였다. 칩 내부에서는 전도 현상만을, 그리고 칩과 바깥 20℃ 대기 사이에는 자연대류 현상만을 고려하여 열전달 해석을 수행하였다. 대류 열전달계수 값은 10 W/m²-℃을 사용하였다. 열전달 해석은 총 30초간의 해석 시간을 가지며 1초씩 총 30번의 해석을 통해 시간대별 칩의 온도 변화 양상을 지켜보았다. Fig. 3에서의 A-A' 방향의 온도 편평도를 Fig.

4 에 나타내었다.

2.3 바이오칩의 제작

DNA추출을 위한 바이오칩은 크게 PDMS반응 조칩과 마이크로 히터와 센서가 집적된 glass 기판으로 구성된다. Si 기판에 음성감광제 (SU-8 3035) 를 사진식각공정을 이용하여 패터닝하여 몰드를 제작한다. 제작된 몰드에 경화제와 10:1비율로 혼합된 PDMS를 붓고 65℃에서 4시간 동안 경화시킨 후에 몰드와 분리한다. punch를 이용하여 주입구 및 배출구를 형성한 뒤 O₂ plasma 표면 처리 방법으로 slide glass와 PDMS를 접착시켜 완성한다. Glass 기판 제작을 위해 유리기판(Pyrex 7740, Dow Corning, U.S.)에 열기상 증착법 (thermal evaporation)으로 크롬과 금을 각각 200 Å /1000 Å 두께로 증착시킨다. 사진식각공정을 이용하여 설계된 형상으로 양성감광제(AZ 1512)를 패터닝한다. 그 다음 크롬과 금을 식각액을 사용하여 식각하고 양성감광제를 제거하여 glass 기판의 제작을 완료한다.

2.4 시스템의 구성

최종 제작된 유리칩의 전체 크기는 20×28mm이고 PDMS 칩은 18×25mm이다. 온도 제어 시스템은 전원 공급기(E3631A, Agilent Technology, U.S.A), 데이터 수집 보드(PCI-6024E, National Instrument, U.S.A), 열전대에서 나오는 미약한 전압 신호를 증폭하고 노이즈를 걸러내는 신호 처리기(signal conditioner, SC2345, National Instrument, U.S.A)로 구성되어 있다. 전원 공급기를 통해 칩에 일정량의 전압을 공급하고 신호 처리기를 통해 데이터 수집 보드에 연결된 박막 형태의 온도센서는 반응조 내부의 온도를 수집한다. 이러한 온도 제어 시스템은 LabVIEW 7.0(National Instrument, U.S.A) 소프트웨어를 이용해 제어하였다.

3. 실험 결과 및 토의

3.1 세포용해 실험

구강세포에서 DNA를 추출하기 위해서는 우선 단단한 세포막을 깨서 세포내의 구성물들을 분해시키는 과정이 필요하다. 세포의 분해는 세포막을 녹이는 화학물질(lysis buffer)을 이용하거나 세포가 포함된 시료를 고온으로 가열하여 분해시키

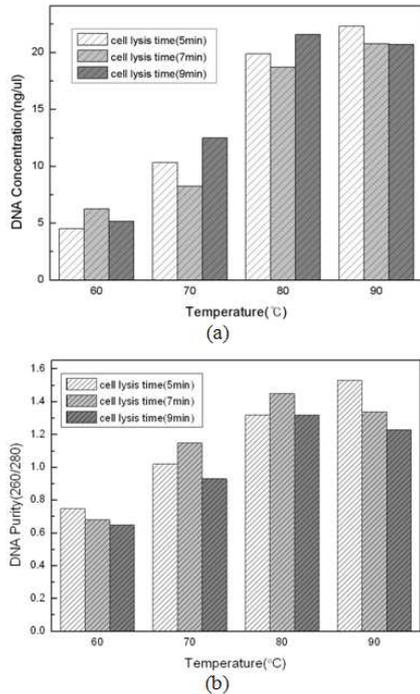


Fig. 5 Results of cell lysis and DNA purification in conventional method: (a) DNA concentration, (b) DNA purity

는 방법 등이 있다. 본 연구에서는 마이크로 히터를 이용하여 바이오칩 반응 채널 내부를 일정 온도로 가열하여 세포의 용해를 수행하였다. 우선 가열을 통한 세포 용해 효율을 높이기 위해 세포의 적정 가열 온도를 찾아야 한다. 일반적으로 가열에 의한 세포용해 반응은 70°C 이상에서 수행된다고 알려져 있다. Ke 등⁽⁴⁾은 실리콘재질의 반응조를 이용하여 95°C에서 2분간 E. coli를 가열하여 세포용해 반응을 마이크로 칩에서 수행하였다.

본 연구에서는 바이오칩에서의 세포용해의 최적 반응조건을 도출하기 위해, 세포가 포함된 시료의 온도를 70, 80, 90°C로 변화 시켜 실험을 하여, 가열 온도에 따른 세포분해 효율을 측정해 보았다. 또한 온도에 따른 가열 시간을 달리하여 세포분해 효율의 변화도 확인하였다. 가열 시간은 5, 7, 10분으로 변화를 주어 실험을 하였다. 일반적으로 생화학 실험에 사용되는 heat block으로 시료를 가열하고 원심분리기를 이용하여 이때 분해된 세포가 섞여 있는 시료에서 DNA를 추출하였다. 자외선 분광광도 비색 측정법을 이용한 DNA 농도 측정기(NanoDrop ND-1000, nanodrop-technologies, Inc, U.S.A.)를 이용하여 반응 후의

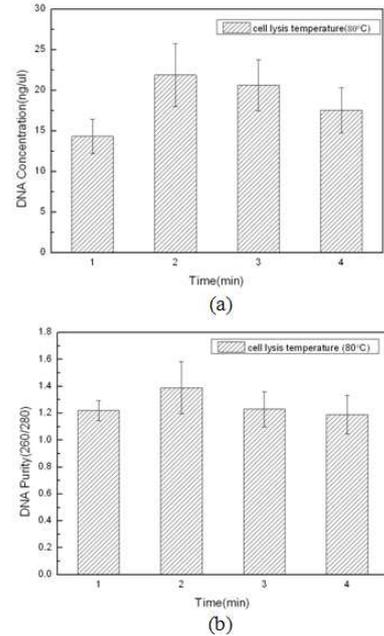


Fig. 6 Results of cell lysis and DNA purification in microbiochip: (a) DNA concentration, (b) DNA purity

DNA의 농도 (concentration)와 순도 (purity)를 측정하여 DNA추출 효율을 평가하였다.

실험결과는 Fig. 5와 같다. 온도에 따른 효율에서는 80°C 이상에서 DNA의 농도와 순도가 높게 나왔는데 이는 70°C 이하에서 세포용해가 제대로 이뤄지지 않았기 때문으로 생각된다. 세포용해 시간에 따른 영향은 실험 조건인 5, 7, 10분에서 별 다른 차이를 보이지 않았다. 시간에 따른 효율을 더 자세히 알아보기 위하여, 본 연구에서 개발한 바이오칩을 이용하여, 여러 온도에서 세포용해 반응 실험을 수행하여 보았다. 세포용해 온도는 앞선 실험 결과를 토대로 80°C로 하였고 용해 반응 시간을 1, 2, 3, 4분으로 하였다. Fig. 6의 실험결과를 보면 반응시간이 2분인 경우가 DNA의 농도와 순도가 가장 높게 나왔다. 2분 정도의 반응 시간이면 세포용해 반응이 충분히 수행되는 것으로 생각된다. 따라서 바이오칩에서의 세포용해 반응 조건은 80°C, 2분으로 결정하였다.

3.2 시료전처리 실험

바이오칩에서의 세포용해와 DNA추출의 성능을 평가하기 위해 세포용해 반응 후 DNA추출 과정 전 후의 시료들을 채취하여 각각의 DNA농도와 순도를 측정하여 보았다. 그 결과는 Table 1에 나

Table 1 DNA concentration($\text{ng}/\mu\text{l}$) and purity(260/280) before and after DNA purification on microchip

	Before purification	After purification
DNA concentration (ng/ml)	23.95	20.17
DNA purity(260/280)	0.93	1.62

타내었다. 세포 용해 반응 후의 DNA의 농도는 $23.96 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 로 측정되었고 DNA의 순도는 바이오칩에서의 정제 과정을 거치면서 0.93에서 1.62로 높아지는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 바이오칩 상에서 세포용해가 이루어지고 DNA가 추출되었음을 확인할 수 있었다.

3.3 중합효소 연쇄반응 실험

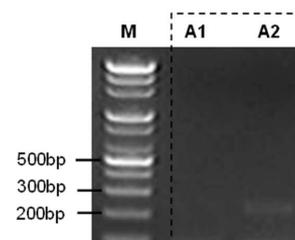
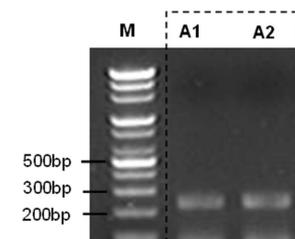
새로 고안된 바이오칩에 의한 시료전처리 효율을 확인하기 위하여, 바이오칩에 의해 추출된 DNA에 대해 중합효소 연쇄반응 (PCR) 실험을 하였다. 추출된 DNA 샘플 중에서 SY158 유전자를 대상으로 하여 PCR을 통한 유전자 증폭을 수행하였다. SY158은 남성 불임 유전자 진단에 사용되는 남성 Y 염색체에 존재하는 유전자이다. PCR을 위한 시료의 조성은 Table 2 와 같고 실험은 PCR 장치(Primus 96 Thermocycler; MWG, U.S.)를 이용하여 수행하였다.

실험에 쓰인 시료는 구강세포를 가지고 바이오칩에서 얻어진 genomic DNA ($20\text{ng}/\mu\text{l}$)와, $10\times\text{ExTaqTMBuffer}$ (Takara사), dNTP Mixture (2.5mM each), TaKaRaExTaqTM ($5\text{unit}/\mu\text{l}$), BSA (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) 이며, 시발체 (Primer, Bionics, Korea)는 SY158 forward primer ($5'\text{-ACAGTGGTTTGTA GCGGGTA-3}'$, 20bp)와 SY158 reverse primer ($5'\text{-CT CAGAAGTCCTCCTAATAGTCC-3}'$ 24bp)가 쓰였다. PCR 온도 순환 조건은 변성 전 단계 (pre-denature)로 95°C 에서 240초 반응 1회, 변성 단계 (denature)로 95°C 에서 15초 반응, 결합 단계 (annealing)로 60°C 에서 15초 반응, 신장 단계 (extension)로 65°C 에서 30초 반응을 총 35회 순환 반복을 수행하였다

세포 용해 후 마이크로 비드에 의해 정제된 시료와 정제되지 않은 시료를 이용하여 PCR 실험을 수행하였다. Fig. 7과 8은 PCR을 수행한 결과물의 겔 전기영동 사진이다.

Table 2 Quantity of components of sample ($20\mu\text{l}$) for SY158 gene PCR using proposed integrated microchip and conventional PCR machine (unit: μl)

Component	Chip	Machine
Nuclease free water	14.4	8.4
10X Buffer	2.0	2.0
dNTP	2.0	2.0
Primer SR158 F	0.2	0.2
Primer SR158 R	0.2	0.2
Additive [BSA]	0.0	3.2
Template	1.0	3.0
Taq polymerase ($5\text{unit}/\mu\text{l}$)	1.0	1.0

**Fig. 7** PCR results (buccal cell gene DNA) without purification: Lane M (100bp marker), Lane A1 and A2 (conventional PCR).**Fig. 8** PCR results (buccal cell gene DNA) with purification: Lane M (100bp marker), Lane A1 and A2 (conventional PCR)

먼저, DNA를 정제하지 않고 PCR을 수행한 경우에는 Fig. 7과 같이 두 번의 PCR실험 결과에서 한 경우에만 아주 희미하게 밴드가 나타났다. 바이오칩 내에서 마이크로 비드를 이용하여 DNA를 정제시킨 후 추출하여 PCR을 수행한 경우에는 Fig. 8과 같이 두 경우 모두 뚜렷하게 밴드가 뜨는 것을 확인할 수 있었다. PCR이 원활히 실행이 되었다면 겔 전기영동 사진에 유전자 밴드가 뚜렷하게 나타나야 한다. 따라서 DNA 정제 과정

을 거치지 않은 DNA의 순도가 낮은 시료의 경우, DNA의 농도가 높더라도 시료 내에 섞인 DNA 이외의 단백질과 같은 불순물들이 PCR을 방해해 정상적인 PCR이 이뤄지지 않는 것을 알 수 있었다. 바이오칩을 통해 DNA 정제 과정을 거친 경우에는 PCR결과가 정상적이므로, 시료전처리 과정이 성공적으로 수행되었음을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 논문은 PDMS와 파이렉스 유리를 이용해 구강상피 세포의 세포용해와 DNA추출을 빠르게 수행하는 마이크로바이오칩을 설계, 제작 하였다. 제작된 바이오칩에 세포용해에 필요한 열에너지를 공급하기 위한 온도 제어 시스템을 구축하였다. 실리콘 대신 PDMS, 유리를 사용함으로써 제작 공정을 단순화 시키고 칩의 제작 단가를 낮추어 향후 일회용 바이오칩으로써의 가능성을 보여주었다. 제안된 마이크로바이오칩을 가지고 간단하게 사람의 구강세포를 채취하여 시료전처리 과정을 수행하고 DNA를 추출할 수 있었다. μ TAS에 보다 가까운 마이크로바이오칩 구현을 위해서, 개발된 바이오칩 상에서 DNA가 정제된 후에 PCR 공정까지 구현할 수 있는 집적화 칩을 현재 연구 개발 중에 있다.

후 기

이 논문은 2010년도 두뇌한국 21 사업에 의하여 지원되었으며, 이에 관계자에게 감사드립니다.

참고문헌

- (1) Elizabeth, Y. H., Mather, L and Bell, J. L., 2002, "MEMS-Based Sample Preparation for Molecular Diagnosis," *Anal Bioanal Chem*, Vol. 371, pp. 49~65.
- (2) Schilling, E. A., Kamholz, A. E. and Yager, P., 2002, "Cell Lysis and Protein Extraction in a Microfluidic Device with Detection by a Fluorogenic Enzyme Assay," *Analytical Chemistry*, Vol. 74, pp. 1798~1804.
- (3) Lee, D. W and Cho, Y.-H., 2008, "A Continuous Electrical Cell Lysis Chip Using a DC Bias Voltage for Cell Disruption and Electroosmotic Flow," *Trans. of the KSME (A)*, Vol. 32, No. 10, pp. 831~835.
- (4) Ke, C., Kelleher, A.-M., Berney, H., Sheehan, M. and Mathewson, A., 2007, "Single Step Cell Lysis/PCR Detection of Escherichia Coli in an Independently Controllable Silicon Microreactor," *Sensors and Actuators B*, Vol. 120, pp.538~544
- (5) De Mello, A. J. and Bread, N., 2003, "Dealing with Real Samples: Sample Pre-Treatment in Microfluidic Systems," *Lab Chip*, Vol. 3, pp. 11N~19N.
- (6) Witek, M. A., Liopis, S. D., Wheatley, A., McCarley, R. L. and Soper, S. A., 2006, "Purification and Preconcentration of Genomic DNA from Whole Cell Lysates Using Photoactivated polycarbonate (PPC) Microfluidic Chips," *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, No. 10, Article No. e74.
- (7) Lee, C.-Y., Lee, G.-B., Lin, J.-L., Huang, F.-C. and Liao, C.-S., 2005, "Integrated Microfluidic Systems for Cell Lysis, Mixing/Pumping and DNA Amplification," *J. Micromech. Microeng.* Vol. 15, pp. 1215~1223.
- (8) Yang, J., Liu, Y., Rauch, C. B., Stevens, R. L., Lui, R. H., Lenigk, R. and Grodzinski, P., 2002, "High Sensitivity PCR Assay in Plastic Micro Reactors," *Lab Chip*, Vol. 2, pp.179~187
- (9) Shin, Y. S., Cho, K. C., 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) 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.