

# 멤스 기반의 캔틸레버 형 전극을 가진 마이크로 디바이스를 이용한 단일세포의 Electroporation 및 유전자 Transfection

## Single-cell Electroporation and Gene Transfection using MEMS-based Microdevice with Cantilever-type Microelectrode

조영학<sup>1,✉</sup>, 김범준<sup>2</sup>  
Young Hak Cho<sup>1,✉</sup> and Beomjoon Kim<sup>2</sup>

1 서울산업대학교 기계설계자동화공학부 (School of Mechanical Design & Automation Engineering, Seoul Natl. Univ. of Tech.)

2 동경대학교 정밀기계공학과 (Precision Mechanical Engineering, the Univ. of Tokyo)

✉ Corresponding author: yhcho@snut.ac.kr, Tel: 02-970-6361

Manuscript received: 2010.2.4 / Accepted: 2010.4.5

*In this paper, we present details on fabrication of single-cell electroporation microdevice, practical experiments of single-cell electroporation with our fabricated microdevice. Also, the continuous electroporation for the continuous flow of cells is used for high-throughput electroporation. The delivery efficiency and cell viability tests are provided and the successful GFP transfection into cells is also evaluated with a fluorescent microscope after electroporation. This device enables to reduce the size of samples and thus the use of small amount of reagents. Also, it makes it possible to permit to avoid cell discrimination (transfected cells versus non-transfected cells) encountered when traditional bulk electroporation is held.*

Key Words: Electroporation (전기천공법), Microcantilever-type Microelectrode (마이크로 캔틸레버 형 미세전극), Green Fluorescent Protein (GFP; 초록형광단백질), Gene Transfection (유전자 트랜스펙션)

### 1. 서론

세포 내부로의 유전자 도입 및 transfection 은 분자생물학에 있어서 핵심적인 기술로 유전자 치료와 같은 목적을 위해 필수적인 전제조건이다. 유전자 도입 및 transfection 의 효율을 극대화하는 것은 외래 DNA 등의 성공적인 세포로의 전달을 위해 필요 불가결한 것으로, 많은 이들에 의해 연구되고 있다. 지금까지 plasmid DNA, RNA, 그리고 약물과 같은 많은 생물학적, 의학적 관심대상들을 세포막을 통해 세포 내부의 세포질 속으로 도입하기 위한 많은 화학적, 물리적 기술들이 연구되었다.<sup>1</sup> 이와 같은 기술 가운데, electroporation 은 강력

하고 널리 이용된 방법으로 낮은 독성을 가지며 생체내외에서 다양한 세포 내부로 DNA 등과 같은 물질을 도입할 수 있다. Electroporation 은 높은 전기장을 이용하여 세포막을 이루는 지질 이중막 (lipid bilayer) 의 절연파괴(breakdown)를 야기하고 세포막에 일시적인 또는 영구적인 구멍을 만들고 이를 통해 정상 상태에서는 세포막을 통과할 수 없는 큰 분자량을 가진 외부 물질을 도입하게 된다. 일시적인 구멍의 경우 일정 시간이 지나게 되면 원상복귀가 되나, 영구적인 구멍의 경우 세포를 죽음에 이르게 한다.

최근 들어, 전해액으로 채워진 모세관 및 마이크로 칩 등을 이용한 단일세포 electroporation 이

높은 관심과 함께 연구되고 있다.<sup>2,5</sup> 성공적인 단일 세포 electroporation 을 통한 유전자 도입 및 transfection 을 위해서는 대상이 되는 세포를 주변의 다른 세포로부터 격리시켜 하나의 세포에만 전기장을 가해주는 것이 필요하며, 마이크로 가공에 의해 제작된 디바이스들은 이러한 것을 가능하게 한다.<sup>6,8</sup> 실제, MEMS 기술은 마이크로미터 단위의 가공을 가능하게 하여 단일세포 또는 단백질, DNA 크기 수준에 접근을 가능하게 하여 이전에는 불가능하였던 마이크로미터 수준의 대상을 조작하고 분석하는 것이 가능하다.<sup>9</sup> 또한, 미세 캔틸레버를 이용한 나노-바이오 센서의 개발에도 활발히 이용되고 있다.<sup>10</sup>

이 논문에서는 캔틸레버 형 마이크로 전극을 가진 electroporation 용 마이크로 디바이스의 제작 과정을 보이고, 이를 가지고 낮은 전압 및 높은 주파수의 pulse 를 이용, 단일세포 수준에서의 electroporation 을 수행한다. 제작된 electroporation 용 마이크로 디바이스는 세포에 거의 해를 주지 않고 높은 효율을 보여 electroporation 후에 유전자 도입에 실패한 세포들을 구별해 내는 작업을 피할 수 있다.

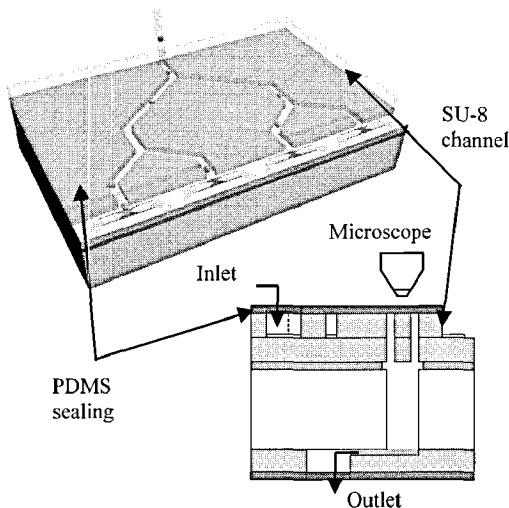


Fig. 1 Schematic view of device

## 2. 제작 및 실험

### 2.1 제작 공정

Fig. 1 은 SU-8 마이크로 채널과 전기장의 집중을 위해 디자인된 캔틸레버 형 마이크로 전극을

가진 electroporation 용 마이크로 디바이스의 개략도이다. 세포들은 마이크로 채널에 의해 흐름이 유도되고 나누어지며, 낮은 전압(1V 이하)이지만 아주 작은 간격(~15 $\mu$ m) 을 가진 전극에 의해 높은 전기장을 가해 주게 된다. 세포들은 순차적으로 하나씩 전극 사이를 지나며, 연속적인 electroporation 이 가능하다. 또한, 평면 전극이 아닌 3 차원의 캔틸레버 위에 전극이 형성되어 있기 때문에 세포의 중심부에 전기장을 가해 주는 것이 가능하다.

Fig. 2 는 마이크로 디바이스의 제작 공정을 나타내고 있다. 10 $\mu$ m 두께의 상층부 Si 층과 500 $\mu$ m 의 bulk layer 사이에 1 $\mu$ m 두께의 SiO<sub>2</sub> 층을 가진 SOI (silicon-on-insulator) 웨이퍼를 이용하여 제작한다. 먼저, Positive Photoresist 를 이용하여 SOI 웨이퍼의 상층부 Si 층에 마이크로 캔틸레버를 패터닝한 후, ICP-RIE(inductively coupled plasma reactive ion etching)를 이용, 날카로운 끝을 가진 마이크로 캔틸레버를 제작한다(Fig. 2(a)(b)). ICP-RIE 에 의한 Si 에칭은 중간층인 SiO<sub>2</sub> 층에 의해 자동적으로 멈추게 된다. LPCVD(low-pressure chemical vapor deposition) 장치를 이용하여 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 층을 200nm 이상 증착하여 전기절연층을 만든 후, Cr/Au 를 열증착기(thermal evaporator)를 이용하여 증착, 마이크로 캔틸레버 위에 마이크로 전극을 패터닝한 후 금속을 에칭한다(Fig. 2(c)). 전극을 만든 후 SU-8 을 패터닝하여 마이크로 채널을 제작한다(Fig. 2(d)). SU-8 을 이용한 채널 형성은 간단한 batch 공정에 의한 것으로 스핀 코팅과 UV 노광(exposure) 그리고 현상(development) 공정을 거치게 된다. SOI 웨이퍼의 반대쪽 면에 Si 에칭을 위한 마스크로 사용할 알루미늄 층을 증착한 후 이를 패터닝한다. 앞면과의 alignment 를 위해 양면 aligner 를 사용하였으며, ICP-RIE 에 의해 bulk Si 층을 에칭한다(Fig. 2(e), bottom side view). 이 역시 중간층인 SiO<sub>2</sub> 층에 의해 자동적으로 멈추게 된다. 마지막으로 SiO<sub>2</sub> 층을 BHF 를 이용하여 제거하게 되면 Fig. 2(f)의 바닥으로부터 본 바와 같이 출구부가 형성된다. 친수성 성질을 가진 11-Mercaptoundecanoic acid (11-MUA) 용액에 마이크로 디바이스를 넣고 수분 후 꺼내어 에탄올과 탈이온수로 씻으면 Au 층 위에 자동적으로 자기조직화단분자막 (SAM; Self-assembled monolayer)이 형성된다.

SU-8 마이크로 채널과 poly(dimethylsiloxane) (PDMS, Dow Corning.) sealing 층과의 본딩은 채널 sealing 에 자주 이용되며 O<sub>2</sub> plasma 처리를 통해 유

앞에 견딜 수 있을 정도로 단단히 붙게 된다(Fig. 2(g)). SU-8 마이크로 채널과 PDMS 층의 align 을 위한 윤활제로서 메탄올을 사용하였다. 그 후 완성된 마이크로 칩은 약 5kPa 의 압력으로 누르면서 80°C의 hot-plate 위에 30 분 정도 놓아두어 두 층 사이의 메탄올을 제거한다. 이로써 두 층은 더욱 단단하게 접합하게 된다.

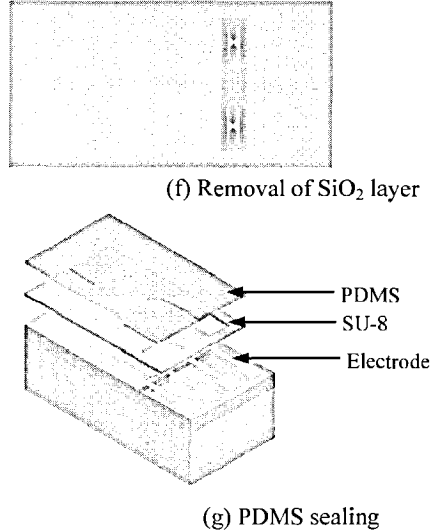
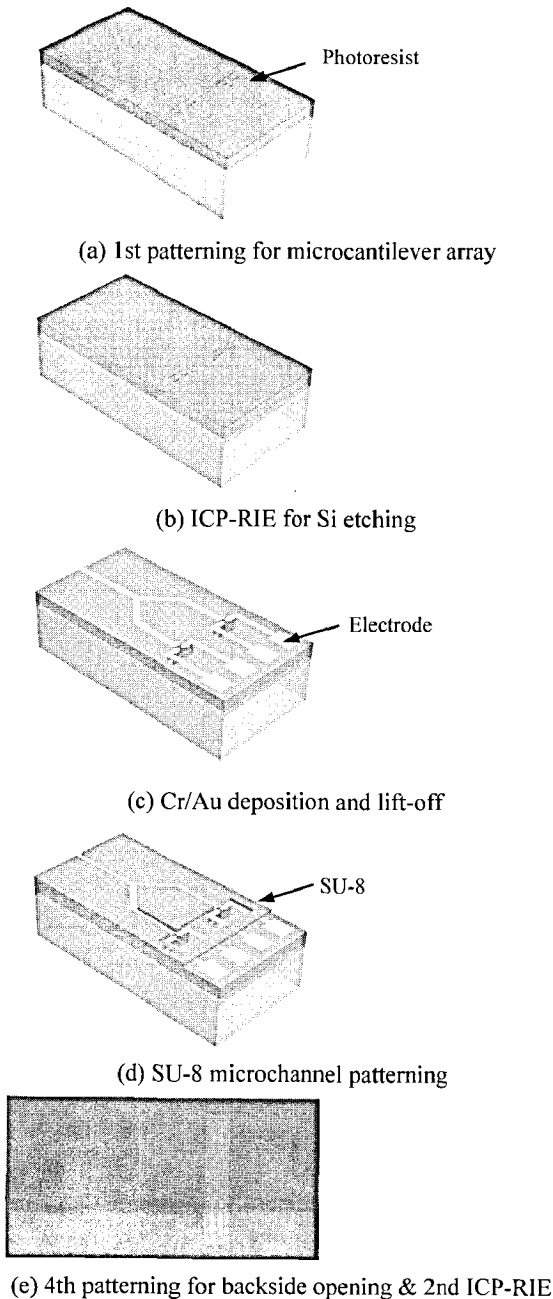


Fig. 2 Fabrication process of microchannels and twin microcantilever arrays

## 2.2 Electroporation 실험

Fig. 3 은 electroporation 을 위한 실험장치 및 제작된 마이크로 디바이스의 전체적인 패키징을 보여주고 있다. 모든 실험은 현미경 아래에서 이루어졌으며, 세포의 흐름 및 일정한 유량을 유지하기 위해 syringe pump (KDS200, KD Scientific Inc., USA)를 사용하였다. 사용된 pulse generator (Model 5062, Tabor Electronics Ltd., Japan)는  $\pm 5V$  의 전압과 수십 ns 의 duration 을 가진 임의 파형의 pulse 를 연속적으로 가하는 것이 가능하며, Fig. 4 에 나타난 형태의 pulse 를 사용하여 electroporation 실험을 하였다. Pulse duration 은 100, 200, 500  $\mu s$  에 대해 pulse width 는 1, 2, 10ms 로, 가해진 전압은 각각  $\pm 0.7$  와  $\pm 1V$  이었으며, 총 10 번의 pulse 를 반복적으로 가해주었다.

본 연구에서 제작된 단일세포 electroporation 과 기존의 전통적인 bulk electroporation 의 주요한 차이는 다음과 같다. 첫째, 전체 시스템에 사용되는 전압이 1000V 이상의 고압에서 1V 이하의 저압을 이용하며, 둘째, 평판 전극에서의 일정한 전기장이 아닌 불균일한 전기장(inhomogeneous electric field)<sup>11</sup> 를 이용하며, 셋째 전극과 세포 사이의 거리가 아주 짧다. 즉, 제작된 마이크로 디바이스를 이용하여 세포들에 대해 국부적인 electroporation 을 일으킬 수 있다. 작은 간격 및 날카로운 끝을 가진 전극 덕분에, 낮은 전압을 통해 electroporation 이 가능하며, 비가역적인 구멍형성을 통한 세포 괴사의

결과를 피할 수 있다. 또한, 높은 전압을 가했을 때 발생하는 유체의 급격한 온도상승과 이에 따른 유체 내에서의 기포발생과 같은 문제점<sup>12</sup>들이 감소하게 된다.

실험에 사용한 세포는 A549 cells (human alveolar basal epithelial cells)과 Jurkat, Clone E6-1 (Acute T cell leukemia, human)로 일본 대일본주우제약 주식회사 (大日本住友製薬株式会社, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)에서 구입하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 인큐베이터(incubator)에서 배양하였다.

Electroporation의 결과를 정량적으로 확인하기 위해 PI(propidium iodide, Molecular Probes) 형광염료를 사용하였다. 이는 DNA를 염색하는데 사용되며, 일반적으로 세포막을 통과할 수 없는 핵산 염료이나, 핵산에 붙게 되면 형광빛을 낸다. 따라서, electroporation 후 세포 내부로 들어가게 되면 세포 내의 DNA/RNA와 반응하여 자외선 광원(UV light)의 excitation에 의해 붉은 색의 형광빛을 발산한다. PI-DNA 결합물의 excitation 및 emission 파장은 각각 535nm 및 615nm이다.

Electroporation 후 세포의 생존력(cell viability)을 알아보기 위해 trypan blue(Dojindo Molecular Technology)를 이용하여 세포들을 염색하였다. Electroporation 실험 후 30분 정도의 시간이 경과한 후 세포들을 trypan blue 염료가 든 완충 용액에 넣었다. 세포막 불투과성 염료인 trypan blue는 보통 낮은 농도에서는 관찰되지 않는다. 즉, 살아있는 세포는 투명한 색을 띠지만, electroporation에 의해 세포막에 생긴 구멍이 원상복귀가 되지 않아 죽거나 죽은 세포에는 trypan blue 염료가 점점 세포 내에 모이게 되어 검푸른색이 뚜렷해진다.

본 연구에서는 GFP 발현 유전자 또한 성공적

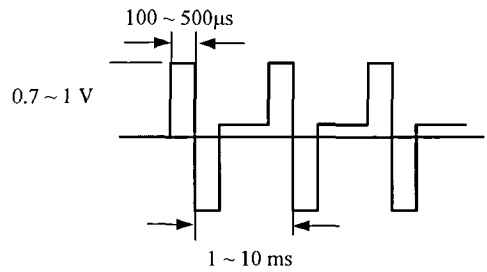


Fig. 4 Applied pulse conditions

인 transfection의 확인을 위해 사용되었다. 사용된 GFPuv gene(6089-1, Clontech Co.)는 발현인자로서 자주 사용되며, 최대 excitation 및 emission 파장은 각각 395nm 및 509nm이다. GFP gene을 electroporation을 통해 세포 내에 주입한 후 44시간 동안 배양하였다.

### 3. 결과 및 분석

#### 3.1 Electroporation 용 마이크로 칩

Fig. 5는 마이크로 캔틸레버 위에 패턴되어진 마이크로 전극의 SEM 사진들이다. 마이크로 캔틸레버의 두께는 10µm, 길이는 65µm, 폭은 15µm이다. 패턴된 마이크로 전극의 두께는 Cr 층은 20nm, Au 층은 100nm이다. 전극 사이의 간격은 10~20µm로 electroporation 대상인 세포들의 크기를 고려하여 조절하였다. Fig. 6은 마이크로 전극 및 기준 전극(reference electrode)과 마이크로 채널의 현미경 사진이다. 마이크로 채널의 길이는 입구부터 캔틸레버에 이르기까지 4mm, 깊이는 20µm, 폭은 10~40µm이다.

마이크로 채널의 바닥부분은 Cr/Au 층이 채널을 따라 패턴된 후, 친수성의 성질을 지닌 SAM (Self Assembled Monolayer)인 11-MUA(11-Mercaptoundecanoic acid)에 의해 코팅되어 채널 내부가 친수성의 성질을 가지게 된다. 이는 유체 저항을 작게 하여 작은 단면의 채널 내에서 세포들이 하나씩 원활하게 흐를 수 있게 한다. 이전 연구<sup>13</sup>에서는 세포의 흐름을 유도하는 마이크로 채널을 Si 웨이퍼를 에칭하여 만들었으나 본 연구에서의 마이크로 채널은 SU-8 photoresist를 이용하여 제작하였다. SU-8 마이크로 채널을 가진 디바이스는 Si 마이크로 채널을 가진 디바이스와 비교했을 때 몇 가지 장점을 가진다. 마이크로 채널의 깊이 조절을 위해 디바이스 제작을 시작할 때 SOI 웨이

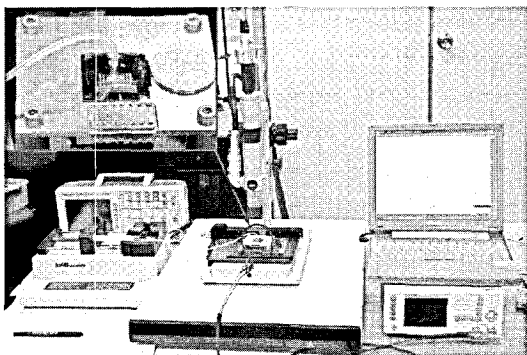


Fig. 3 Experimental setup and complete device with PDMS packaging

피의 두께를 결정할 필요가 없이 자유롭게 SU-8 스핀코팅 공정을 통해 채널의 깊이를 조절할 수 있으며, 본딩을 위한 전극 패드 부분을 위해 경사면이 필요 없게 되어 패터닝 공정을 줄일 수 있다. 게다가, SU-8 과 PDMS 사이의 가역적인 유체 sealing 및 Fig. 5 에서 보이는 바와 같이 기준 전극과 마이크로 전극을 함께 배치할 수 있게 된다.

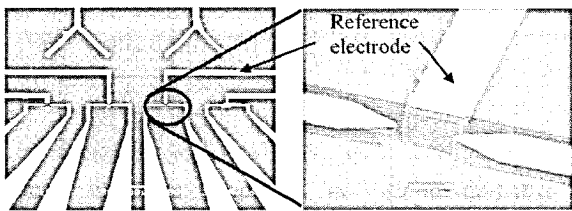


Fig. 5 SEM images of electrode arrays on microcantilever and reference electrode

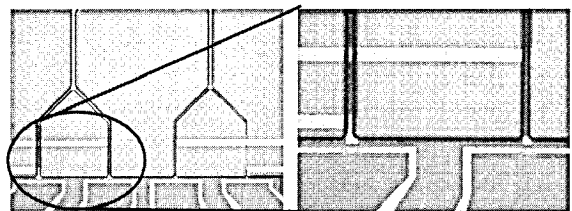
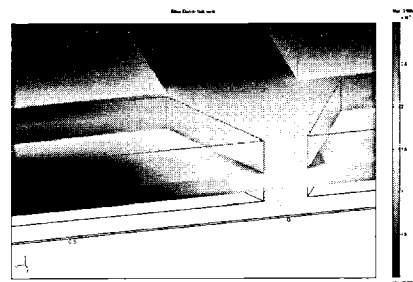


Fig. 6 Microscopy images of SU-8 microchannel and electrode array

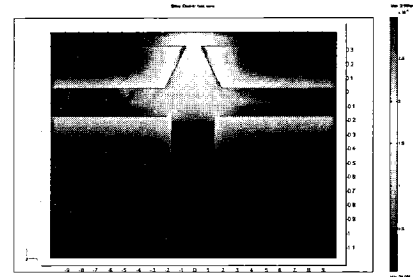
### 3.2 Electroporation 결과 분석

Fig. 7 은 electroporation 중 발생하는 전기장의 크기 및 분포에 대한 이해를 위해 캔틸레버 형 마이크로 전극 주위의 전기장을 시뮬레이션한 결과들이다. 상용 소프트웨어(COMSOL Multiphysics Electromagnetic Module, COMSOL, Inc., Burlington, MA)를 이용하여 FEM 모델링을 통해 electroporation 에 필요한 전압의 크기를 예측하였다. 시뮬레이션 결과, 0.7V 의 전압이 가해졌을 때, 최대 전기장은 전극의 날카로운 끝부분에서 나타나며 그 크기는  $3 \times 10^4$  V/m 이다. 이 결과로부터 전통적인 bulk-electroporation 방법(1000V 이상)에 비해 아주 낮은 전압을 이용하여 단일세포의 국부적 electroporation 이 가능함을 알 수 있다. 즉, 가해진 0.7V 의 전압은 세포막에 구멍을 낼 수 있을 만큼 충분히 큰 전기장을 만들어 낼 수 있으며 이는 단일세포의 electroporation 을 가능하게 한다. 이는 세포막의 유전체 절연파괴(dielectric breakdown)가 일어나는 전압 범위(0.25 ~ 1V) 내에 있다.<sup>14</sup>

세포는 지속적으로 분화하고 단계별로 다른 특성들을 가진다. 따라서, 다량의 세포로부터 얻은 정보는 평균적인 것으로, 기존의 방법으로는 세포 분화의 각 단계에 대한 정보를 얻기가 어렵다. 그러나, 단일세포 electroporation 을 통해서 지속적으로 분화하고 변화하는 하나의 세포로부터 각 단계별로 내부의 생화학적 특성 및 정보를 얻는 것이 가능하다. 또한, MEMS 기술에 기반한 electroporation 용 마이크로 디바이스를 이용하여 유전자의 high-throughput screening 및 단백질 발현, 세포 내 요소들을 대상으로 하는 약물 개발 등에 이용될 수 있다.



(a) Side view



(b) Top view

Fig. 7 Simulation results of electric field around microcantilever electrodes (@COMSOL)

Fig. 8 은 electroporation 후 PI 로 염색된 세포들의 fluorescent-field 사진들이다. Fig. 8 (a)-(b)는 캔틸레버 형 마이크로 전극 위에서 A549 세포들이 electroporation 된 것을 보여주며, Fig. 8 (c)-(d)는 jurkat 세포들이 electroporation 된 것을 보여준다.

Jurkat 세포에 대해 0.7V, 100 $\mu$ s 의 pulse 가 가해졌을 때 PI 형광염료의 전달효율은 95% 이상이었으며, cell viability 실험을 위해 trypan blue 를 이용했을 때 푸르게 염색된 세포가 없었다. 그러나, 0.7V, 500 $\mu$ s 의 pulse 가 가해졌을 때는 약 10%의 세포가 trypan blue 에 의해 염색되었다. 이는 긴

duration 을 가진 pulse 의 경우 세포막에 비가역적 인 구멍을 생성시키며, 이는 세포를 죽게 만들 수 있음을 뜻한다. 이는 이전의 다른 연구들과 비슷한 결과를 보여준다. 유전자 transfection 실험을 위해 electroporation 한 후 GFP 분자를 세포 내에 주입한 후 10~100 개의 세포를 배양하였다. Fig. 9(a),

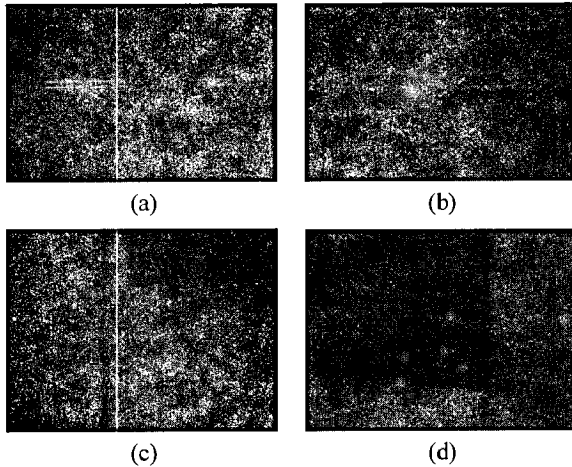


Fig. 8 (a)~(b) Fluorescent-field images of A549 cells on microcantilever after pulse sequence applied, (c)~(d) Fluorescent-field images of electroporated jurkat cells

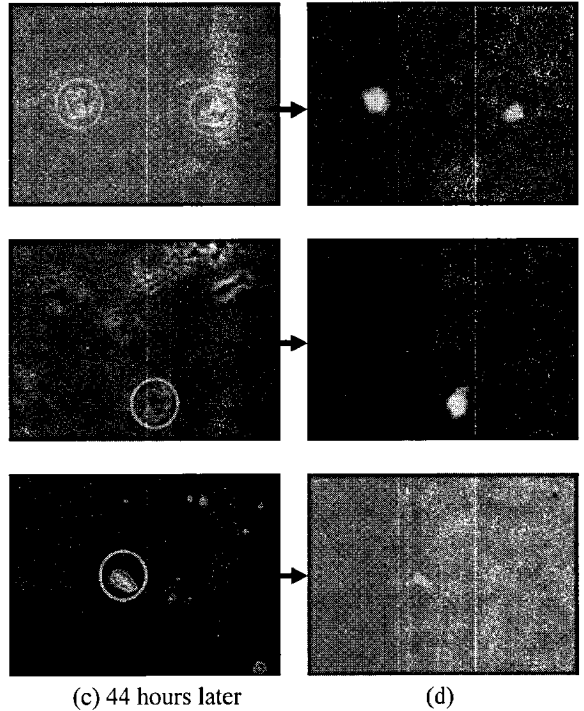
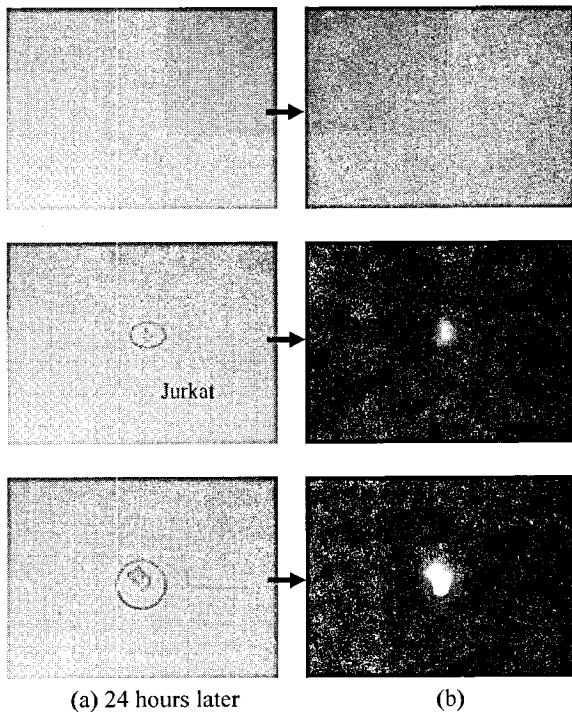


Fig. 9 (a), (c) Bright-field image of electroporated jurkat cells, (b), (d) Fluorescent-field image of electroporated jurkat cells

(c)와 Fig. 9(b), (d)는 각각 bright-field 및 fluorescent-field 의 이미지를 보여준다.

Table 1 은 다양한 조건으로 electroporation 을 했을 때 10~100 개의 jurkat cell 에 대해 세포 생존율을 조사한 결과이다. 0.7V 의 상대적으로 낮은 전압과 100  $\mu$ s 의 짧은 pulse duration 의 경우 99%의 세포생존율을 보이지만, 높은 전압 및 긴 pulse duration 의 경우에는 25% 정도의 세포가 electroporation 후 데미지를 입어 죽는 것을 관찰할 수 있었다(trypsin blue 에 의해 염색됨).

Table 1 Viability of jurkat cells after flow-through electroporation with various electric field intensities. 10~100 cells were examined in each trial

Trial	Voltage	Pulse duration	Viability (%)
1	0.7V	100 $\mu$ s	99%
2	0.7V	500 $\mu$ s	90%
3	1V	100 $\mu$ s	92%
4	1V	500 $\mu$ s	75%

#### 4. 결론

이 논문에서는 단일세포 electroporation 용 마이크로 디바이스를 MEMS 기술을 이용하여 제작하였고, 이를 이용하여 단일세포의 electroporation 을 수행하였다. 즉, 마이크로 채널을 따라 연속적으로 흐르는 세포들이 하나씩 캔틸레버 형 마이크로 전극 사이를 지나갈 때 연속적으로 전기장을 가함으로써 electroporation 을 수행하였다. 이를 통해 높은 수준의 delivery efficiency 및 cell viability 를 달성할 수 있었다. PI 와 trypan blue 를 이용하여 정량적으로 cell viability 를 조사하였으며, 보다 큰 분자인 GFP 를 electroporation 된 세포에 도입한 후 44 시간 이상 배양하는 데 성공하였다. 개발된 단일세포 electroporation 용 마이크로 디바이스는 약물 개발 (drug discovery) 및 유전자 치료(gene therapy) 등에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 후 기

이 연구에 대해 많은 조언 및 도움을 주신 H. Fujita, S. Takeuchi, T. Fujii 교수님께 진심으로 감사드리며, 제작 공정에 도움을 주신 크린룸 스태프 분들께도 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Luo, D. and Saltzman, W. M., "Synthetic DNA delivery systems," *Nature Biotechnology*, Vol. 18, No. 1, pp. 33-37, 2000.
2. Huang, Y. and Rubinsky, B., "Flow-through micro-electroporation chip for high efficiency single-cell genetic manipulation," *Sensors and Actuators A*, Vol. 104, No. 3, pp. 205-212, 2003.
3. Agarwal, A., Zudans, I., Weber, E. A., Olofsson, J., Orwar, O. and Weber, S. G., "Effect of cell size and shape on single-cell electroporation," *Anal. Chem.*, Vol. 79, No. 10, pp. 3589-3596, 2007.
4. Nolkrantz, K., Farre, C., Hurtig, K. J., Rylander, P. and Orwar, O., "Functional screening of intracellular proteins in single cells and in patterned cell arrays using electroporation," *Anal. Chem.*, Vol. 74, No. 16, pp. 4300-4305, 2002.
5. He, H. Q., Chang, D. C. and Lee, Y. K., "Micro pulsed radio-frequency electroporation chips," *Bioelectrochemistry*, Vol. 68, No. 1, pp. 89-97, 2006.
6. Lin, Y. C., Li, M., Fan, C. S. and Wu, L. W., "A microchip for electroporation of primary endothelial cells," *Sensors and Actuators A*, Vol. 108, No. 1-3, pp. 12-19, 2003.
7. Lin, Y. C., Jen, C. M., Huang, M. Y., Wu, C. Y. and Lin, X. Z., "Electroporation microchips for continuous gene transfection," *Sensors and Actuators B*, Vol. 79, No. 2, pp. 137-143, 2001.
8. Khine, M., Lau, A., Ionescu-Zanetti, C., Seo, J. and Lee, L. P., "A single cell electroporation chip," *Lab Chip*, Vol. 5, No. 1, pp. 38-43, 2005.
9. Camou, S., Tixier-Mita, A., Fujita, H. and Fujii, T., "Integration of microoptics in bio-micro-electromechanical systems towards micro-total-analysis systems," *Jap. J. Appl. Physics*, Vol. 43, No. 8B, pp. 5697-5705, 2004.
10. Hur, S., Yun, Y. H. and Lee, S. C., "Nano-bio sensor technology using micro cantilever," *J. of the KSPE*, Vol. 25, No. 11, pp. 22-29, 2008.
11. Matthews, B. and Judy, J. W., "Design and fabrication of a micromachined planar patch-clamp substrate with integrated microfluidics for single-cell measurements," *J. of MEMS*, Vol. 15, No. 1, pp. 214-222, 2006.
12. Lee, S. W. and Tai, Y. C., "A micro cell lysis device," *Sensors and Actuators A*, Vol. 73, No. 1-2, pp. 74-79, 1999.
13. Cho, Y. H., Yamamoto, T., Sakai, Y., Fujii, T. and Kim, B. J., "Development of microfluidic device for electrical/physical characterization of single cell," *J. of MEMS*, Vol. 15, No. 2, pp. 287-295, 2006.
14. Olofsson, J., Nolkrantz, K., Ryttsen, F., Lambie, B. A., Weber, S. G. and Orwar, O., "Single-cell electroporation," *Curr. Opin. in Biotech.*, Vol. 14, No. 1, pp. 29-34, 2003.