

모세관 전기영동 마이크로칩을 이용한 디옥시리보핵산(DNA)의 전류법 검출

주기성*, 하곤*, Sandeep K. Jha*, 이현호**, 윤태식*, 강지중*, 김용상*,***
 명지대학교 나노공학과*, 명지대학교 화학공학과**, 명지대학교 전기공학과***

Amperometric detection of DNA using capillary electrophoresis on microchip

Gi-sung Joo*, Kon Ha*, Sandeep K. Jha*, Hyun Ho Lee**, Tae-Sik Yoon*, C. J. Kang*, Yong-Sang Kim*,***
 Dept. of Nano Science & Engineering, Myongji University*
 Dept. of Chemical Engineering, Myongji University**
 Dept. of Electrical Engineering, Myongji University***

Abstract - 마이크로칩 형태에서의 모세관 전기영동과 전류법을 이용하여 디옥시리보핵산(DNA) 단편들의 분리 검출하는 실험을 하였다. 마이크로 채널이 형성된 PDMS(polydimethylsiloxane)와 금 전극이 형성된 유리 기판을 접합하여 마이크로칩을 제작하였다. 20V/cm의 전계를 인가하여 100bp-1.5kbp 길이의 DNA 단편을 모세관 전기영동 하였을 때 250초내에 분리 검출되는 것을 확인하였다.

1. 서 론

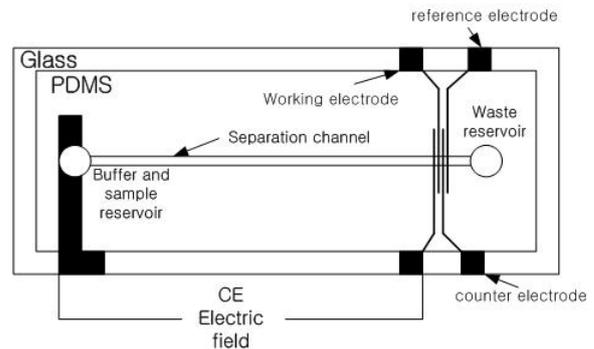
반도체 공정 기술을 이용한 맵스(MEMS, microelectromechanical system)의 개발은 생화학 실험에 있어서 시료의 양과 실험 시간의 절약이라는 이점을 가지는 마이크로바이오칩에 대한 연구를 가능하게 하였다. 이러한 마이크로바이오칩을 이용한 바이오 시료에 대한 연구가 진행 중에 있으며, 많은 바이오 시료 중에서 생물학적 유전자 정보를 담고 있는 디옥시리보핵산(DNA)을 대상으로 한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 단백질과는 다르게 세포 내에서 별도의 물질로 존재하지 않는 DNA를 특정 부위만을 분리해 내 적절히 조작하여 유전물질을 개조시키는 유전공학에 있어서 DNA를 조작하고 분석하는 일은 매우 중요하다. DNA 분리 분석하는 방법으로 마이크로칩에서의 모세관 전기영동을 이용한 방법이 많은 연구자들에 의해서 연구되어지고 있다.[1-5] 모세관 전기영동을 이용하면 DNA를 크기에 따라 쉽게 분리할 수 있다. 분리된 DNA를 검출하는 방법으로는 주로 광학적인 방법이 많이 사용되어져왔다. 광학적인 방법을 사용하면 DNA 검출의 감도는 매우 민감하나 광학적으로 검출하기 위해서 DNA에 염료를 첨가하는 과정이 필요하고 마이크로칩에 광학적인 측정을 하기 위한 장치가 필요하게 된다.

따라서 본 연구에서는 이전에 환경호르몬이나 이온의 검출에 사용되어 왔던 전류법을 사용하여 DNA를 검출하기 위한 실험을 하였다. 모세관 전기영동용 초소형 채널과 전류법으로 DNA를 검출하기 위한 전극이 형성된 마이크로칩을 PDMS(polydimethylsiloxane)와 유리를 사용하여 제작하였다. 제작된 마이크로칩을 사용하여 전류법으로 DNA의 분리 검출을 확인할 수 있었다.

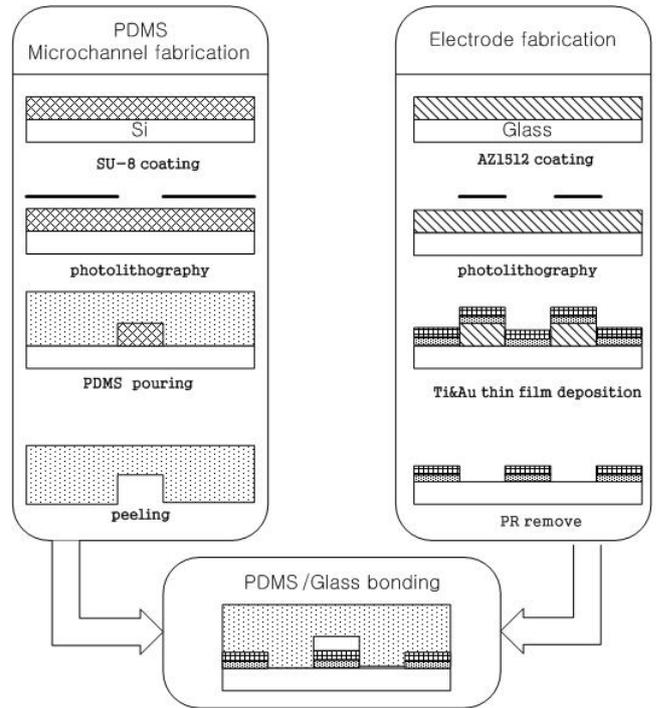
2. 본 론

2.1 마이크로바이오칩 설계 및 제작

본 연구에서 DNA 분리 검출을 하기 위한 마이크로칩의 개략도는 그림 1과 같다. 먼저 완충액 주입구와 배출구 사이의 모세관을 제작하고 이 양단에 전압을 가해주어 모세관 전기영동을 실행한다. 모세관 전기영동이 일어나고 있는 분리채널의 끝 부분에 전류법으로 분리채널 내에서 분리 되어진 DNA들을 검출하기 위한 전극이 위치한다. PDMS와 유리의 접합으로 제작된 마이크로칩의 제작과정은 그림 2에 나타내었다. 칩을 제작함에 있어서 생화학적 안정성이 확인된 PDMS와 유리를 사용하였다. 모세관 전기영동을 하기 위한 채널들은 PDMS로 제작하였고 채널이 형성된 PDMS와 금 전극이 형성된 유리를 접합하여 마이크로칩을 완성하였다. PDMS의 채널은 복사염료법으로 제작하였다. 실리콘 웨이퍼에 음성광양액(negative photoresist, SU-8)를 40μm 두께로 스핀코팅한 후 열처리를 한다. 열처리 후 사진공정(photolithography) 기법을 이용하여 설계한 채널과 모양의 형상을 갖는 주형 패턴을 제작한다. 제작된 주형 패턴에 액체 상태의 PDMS를 경화제와 10:1 비율로 섞어서 부어준다. 부어진 상태에서의 기포를 공기 중에서 제거하여준 후 72°C에서 5시간 동안 굳힌다. 굳어진 PDMS를 웨이퍼로부터 제거한 후 마이크로 채널을 형성 하였다. 그 후 시료를 주입하고 배출하기 위한 입구와 출구를



<그림 1> 마이크로칩의 개략도



<그림 2> PDMS/Glass 마이크로칩 제작 과정

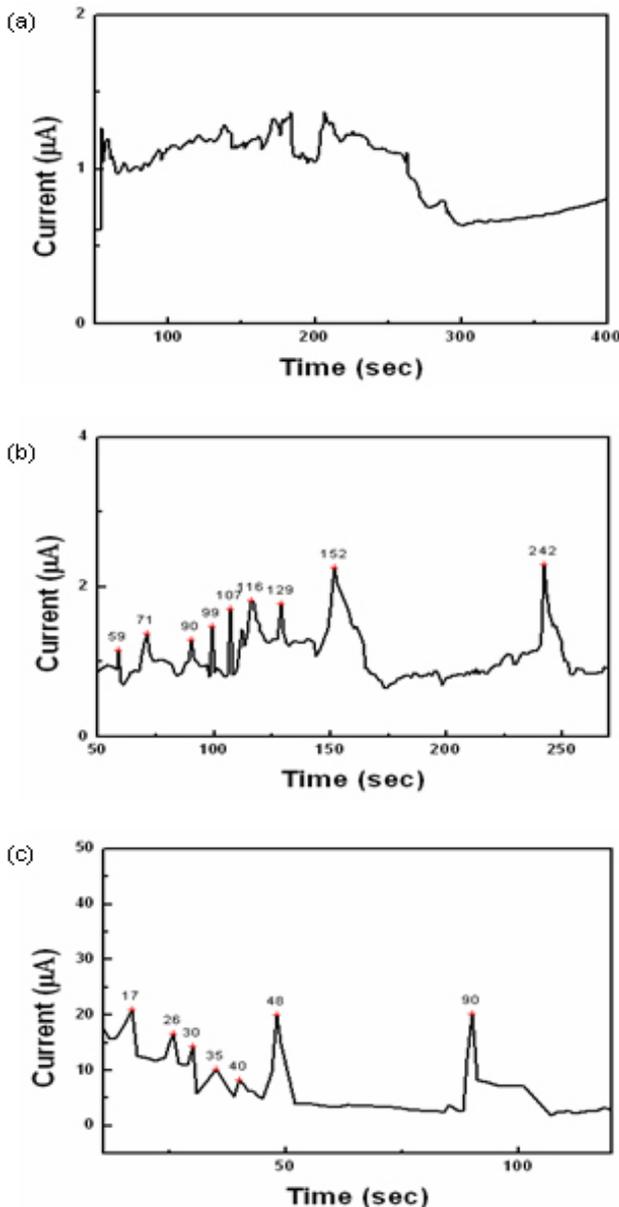
형성하였다. 주형 형들에 의해서 만들어진 마이크로 채널의 깊이는 40μm 이고 너비는 80μm로 제작하였다. 모세관 전기영동을 형성하기 위한 전계를 가해주기 위한 전극과 전류법 측정을 위한 전극을 열기상증착법(thermal evaporation)을 이용하여 유리에 형성하였다. 유리 기판 위에 양성광양액(positive photolithography, AZ-1512)를 2μm 두께로 스핀코팅 한 후 사진공정을 이용하여 패턴을 형성한 뒤 열기상증착장비를 이용하여 접착층으로 티타늄을 1nm 두께로 증착한 후 금 박막을 100nm

증착한다. 금이 증착된 유리를 아세톤을 사용하여 유리 기판위에 남아있는 양성감광액을 제거시켜주면 설계한 전극의 패턴대로 금 전극을 형성하였다. 각기 제작된 PDMS와 유리 기판을 자외선 오존(UV-O₃)클리너를 이용하여 표면처리한 후 접합하였다. 전체 칩의 크기는 40mm x 70mm 이다.

2.2 모세관 전기영동 실험

제작된 마이크로칩으로 DNA를 분리 검출하기 위한 실험을 하기 위해서 제작된 마이크로 채널을 클리닝 해주는 과정을 수행하였다. 아세톤 5분, 초순수 10분, 모세관 전기영동을 형성할 완충용액으로 PBS(Phosphate Buffered Saline) 10분의 순서대로 2회 반복해서 채널에 흘려준 후, PBS 완충용액으로 채널을 채워주었다. 분리 검출하고자 하는 DNA로는 100bp-1.5kbp 범위의 9개 DNA 단편을 사용하여 실험을 진행하였다. 모세관 전기영동에 의해서 채널 내에 분리되는 DNA들을 키슬리-236을 이용하여 0.8V를 인가하고 시간에 따른 전류를 측정하였다.

2.3 결과 및 토론



〈그림 3〉 전기영동 전계에 따른 DNA 단편들의 전류법 측정 전기영동도이다. 전기영동 전계가 (a)10V/cm, (b)20V/cm, (c)40V/cm 각각의 결과이다.

제작된 마이크로칩을 이용하여 인가하는 전기영동 전계에 따른 DNA 단편들의 분리 검출을 실험하였다. 그림 3은 전계가 10V/cm, 20V/cm, 40V/cm 을 인가하여 각각의 전계에 따른 결과들이다. 그림 3에서 전기영동도에 표시된 피크 전류값에 표시된 것은 DNA 단편의 검출되는 시간을 나타낸 것이다. 그림 3(a)에서 전계가 10V/cm에서는 전기영동 전계가 너무 낮아서 전기영동을 하면서 채널 내에서 DNA 단편들의 이동도 차이가 적어 각각의 DNA 단편의 분리가 일어나지 않아서 측정되지 않는 것을 확인 하였다. 그림 3(b)에서 20V/cm을 인가하였을때는 9개 DNA 단편들이 전류법으로 분리되어 검출되는 결과를 확인하였다. 반면 40V/cm을 인가한 경우(그림3(c)), 7개의 피크가 나타나는 결과를 얻었다. 그림 3(b)의 결과와 비교하면, 1.5kbp 단편의 검출 시간이 242초에서 90초로 단축되면서 DNA 단편들의 이동도가 증가한 것을 확인할 수 있다. 전계가 증가함에 따라 DNA의 이동도가 증가하면서 100bp-1000bp 사이의 단편들이 50초내에 검출하는 전극에 도달하고 8개 단편이 빠르게 이동하면서 전류값이 동시에 측정되어 서로 다른 DNA 단편들 사이의 분리가 충분히 이루어지지 않은 것으로 이해되었다. 그림 3의 결과들을 통해 DNA 단편들도 전기영동을 이용하여 전류법으로 분리 검출이 가능함을 확인하였다.

3. 결 론

마이크로칩에서의 모세관 전기영동과 전류법 측정을 이용하여 DNA 단편을 측정하였다. 기존의 마이크로칩에서 DNA 단편을 측정하는 광학적인 방법이 아닌 전류법을 사용하여 DNA 단편들을 측정함으로써 휴대가 가능한 분리 검출하는 센서의 소형화를 가져올 수 있다. 센서의 소형화로 마이크로칩 형태의 다른 미세유체 시스템과의 결합을 통하여 ‘랩온어칩’의 구현이 가능할 것으로 기대된다.

[참 고 문 헌]

- [1] Stephen, C., Jacobson, J. and Ramsey, M., "Integrated microdevice for DNA Restriction Fragment Analysis," *Anal. Chem.*, Vol. 68, pp.720~723. 1996
- [2] King C. Chan, Gary M. Muschik, Haleem J. Issaq, "High-speed electrophoretic separation of DNA fragment using a short capillary", *J. Chromatogr B.*, Vol. 695, pp.113~115. 1997
- [3] N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba, "Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field", *Anal. Chem.*, Vol. 76, pp.15~22. 2004
- [4] M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, "Nanospheres for DNA separation chips", *Nat. Biotechnol.* Vol. 22, pp.337~340. 2004
- [5] Chiung-Wen Kuo, Jau-Ye Shiu, Kung Hwa Wei, Peilin Chen, "Monolithic integration of well-ordered nanoporous structures in the microfluidic channels for bioseparation", *J. Chromatogr A.*, Vol. 1162, pp.175~179. 2007