

분자진단과 마이크로 디바이스 기술을 이용한 현장진단용 (POCT, Point-of care testing) PCR

김소연* · 나형철** · 이영성*** · 김영규****

I. 서론

분자 진단은 DNA/RNA, 단백질 등 생체 지표 물질을 검출하거나 분석하는 분야로, 1985년 시험관에서 유전자를 증폭할 수 있는 PCR (Polymerase Chain Reaction, 중합효소연쇄반응) 기술이 개발되고 인간을 비롯한 Bacteria, Virus 등의 병원체 유전자 지도가 완성되면서 비약적으로 발전하였는데 지난해 세계 PCR 시장 규모는 \$50억이었으며 2015년에는 \$80억에 달할 것으로 예상하고 있다. 분자 진단 방법은 샘플 채취, 유전자 추출, PCR을 이용한 유전자 증폭, 분석에 이르는 4단계로 구성되며, 유전자 증폭 과정을 거치므로 극미량의 병원체에 대해서 매우 높은 민감도와 특이성을 갖는 정확한 진단이 가능하다. 그러나 기존의 진단법은 고가의 PCR 장비와 시약이 필요하며 숙련된 전문가에 의해서만 수행이 가능하며, 장비의 거대함과 진단 과정에서 샘플 오염의 가능성을 항상 내포하고 있다. 또한 분석 시간이 오래 걸리기 때문에 현장에서 유전자 진단을 하는 데 한계를 보이고 있다.

따라서 기존의 단점을 극복하고 현장에서 진단이 가능한 고효율, 고감도의 새로운 병원체 유전자 분석 시스템이 요구되고 있다. 진단 방법 중 랩온어칩 (Lab-on-a-chip: LOC) 기술을 이용한 POCT 진단 (Point-of care testing) 기기는 자원이 제한된 지역에서 질병을 진단하고 모니터링 할 수 있는 잠재력을 제공한다. 랩온어칩 기술은 NT, IT, BT의 융합기술의 대표적 예로 MEMS (Micro electromechanical system)나 NEMS (Nano electro mechanical system)와 같은 기술을 이용하여 시료의 희석, 혼합, 반응, 분리, 정량 등 시료의 전처리와 진단, 분석 단계를 하나의 칩 위에서 수행하도록 하는 기술을 말한다. 이처럼 작은 칩 위에서 모든 반응을 자동화시키고, 빠르게 수행할 수 있다는 특징 때문에 샘플 전처리, PCR, 분석 시스템을 소형화시킨 연구들이 다년간 많이 진행되어 왔고, 이를 통합시킨 유전자 분석 시스템에 대한 연구도 상당히 진행되어 왔다.

이에 본 논문에서는 POCT PCR에 적용할 수 있는 마이크로 디바이스 기술에 대해 살펴보고자 한다.

II. 본문

PCR은 효소를 기반으로 타겟으로 하는 DNA의 염기서열 중 특정 구간을 반복적으로 증폭하여 수백만 가닥의 동일한 유전 물질을 생성하는 반응으로 서로 다른 온도 구간을 반복하여 순환함으로써 진행된다. 소형화된 PCR 칩은 짧은 분석시간, 적은 시약 사용, 빠른 가열 냉각을 지닐 뿐만 아니라 여러 요소 기술의 통합이 가능하며, 장비 구동을 위한 동력 소모 또한 적은 장점을 지닌다. 소형화된 PCR 칩은 일회용 칩으로 교차오

* 김소연, 충북대학교 의생명과학경영융합대학원 석사과정, 010-2729-7731, theiddl2@gmail.com

** 나형철, 충북대학교 의생명과학경영융합대학원 교수, 043-261-2858, rah.remnant@gmail.com

*** 이영성, 충북대학교 의생명과학경영융합대학원 교수, 043-261-2869, lee.medric@gmail.com

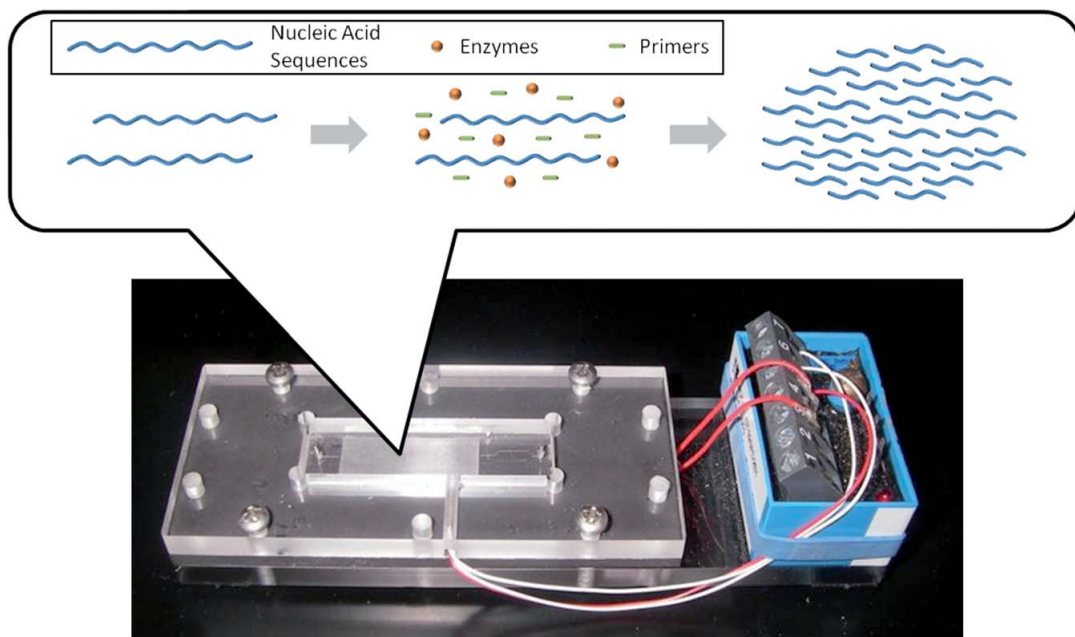
**** 김영규, 충북대학교 의생명과학경영융합대학원 교수, 043-261-2830, ygk@chungbuk.ac.kr

염 또는 생화학적 위험을 줄일 수 있다. 일회용의 소형화된 PCR 칩을 제작하기 위해서는 우선 가격적인 측면과 PCR 성능을 고려하여 칩의 재료를 선택해야 할 필요가 있다. 최근 Polydimethylsiloxane (PDMS), Polymethylmethacrylate (PMMA), Polycarbonate (PC) 등과 같은 고분자 재료들이 저렴한 가격과 제작의 용이성 때문에 각광받고 있다.

1. 등온 PCR

Thermal cycling PCR 법은 변성, 접합, 신장의 세 가지 온도 단계를 정확하게 맞춰 이뤄지는 반응이기 때문에 정확한 온도 구배를 위해서 고가의 장비가 필요하다. 등온 PCR 법은 일정한 온도에서 변성, 접합, 신장이 가능하기 때문에 thermal cycling 법보다 증폭 시간을 단축할 수 있고, 저가의 장비에서도 수행할 수 있다는 장점을 가지고 있어 장비의 소형화에 유리하며 연구실이나 검출 현장 등의 장소에 구애 받지 않고 적용될 수 있다.

마이크로 칩 기반의 등온 PCR은 나노리터 수준의 시료의 양을 사용하기 때문에 기존의 등온 PCR 법보다 경제적이며 빠르고 간편하게 유전자 분석을 수행할 수 있다. 또한 여러 개의 샘플을 동시에 분석 가능할 뿐만 아니라, 온도구배에 민감하지 않으므로 다양한 칩 재질을 선택할 수 있다.



(그림 1) Micro isothermal amplification system

2. 샘플 전처리 마이크로소자

분자진단을 위해서는 사람이나 동물의 세포에서 DNA/RNA를 추출하는 과정이 필요한데 샘플 내에는 inhibitor 요인이 존재하므로 순수한 DNA/RNA 추출 과정이 필요하다. 샘플 전처리는 DNA/RNA와 포획수단과의 결합, 정제, 그리고 추출의 세 가지 단계를 거치며 DNA/RNA 추출 효율, 순도나 오염 등과 같은 부분을 고려하여 진행해야 한다.

1) 졸겔 법(sol-gel process)

마이크로 칩 안에 졸겔 법(sol-gel process)을 이용하여 실리카 마이크로 입자를 형성시키고 회전력에 따라 용액들을 실리카 입자로 흐르게 하였다. 마이크로 채널의 넓이와 깊이에 따라 용액이 흐르는 회전력이 달라지므로 이를 조절하여 RNA 샘플 용액, 정제 용액, 추출 용액을 순서대로 흘려 샘플 전처리를 수행할 수 있다. 모든 용액을 마이크로 칩 위에 주입한 후 단순히 회전력만을 제어함으로써 순수한 바이러스 RNA를 추출할 수 있으며, 5분 만에 고속으로 샘플 전처리 과정을 수행할 수 있다는 장점이 있다.

2) 자성 입자(magnetic bead) 기반 샘플 전처리

자성입자에 실리카 물질을 처리하여 DNA/RNA가 붙을 수 있게 환경을 조성한 뒤 외부의 자석을 이용하여 세포로부터 DNA/RNA만 손쉽게 분리하는 방식으로 이루어진다. 자성입자는 용해액에 의해 분리된 DNA와 결합하여 흐르다가, 자석에 의해 정제 용액과 추출 용액의 흐름을 차례대로 지나게 되면서 최종적으로 샘플 전처리가 이루어진다. 이는 DNA 정제 및 추출이 통합된 자동화 전처리 시스템으로 샘플의 오염 가능성이 적고 빠른 시간 안에 샘플 전처리가 가능하다.

3. 검출용 마이크로 소자

현장에서 사용 가능한 통합 유전자 분석 시스템을 구축하기 위해서 샘플 전처리와 PCR을 통해 증폭된 유전자를 최종적으로 검출하는 시스템이 필요하다. 최근 모세관 전기영동, 마이크로 어레이, 면역 크로마토그래픽 스트립과 같이 증폭된 유전자를 소형화된 시스템에서 검출할 수 있는 방법들이 고안되었고, 이를 마이크로 칩 내부로 소형화시킨 연구들이 이루어지고 있다.

1) 모세관 전기영동 (Capillary electrophoresis)

모세관 전기영동법은 형광염료가 표지된 DNA를 젤이 채워진 모세관에 주입한 뒤 전기장을 걸어줄 때, 모세관을 따라 DNA의 이동속도를 이용한 분석방법이다. 각기 다른 크기의 DNA는 각자의 분자량에 따라 다른 속도로 모세관을 흐르게 되어 크기가 다른 DNA가 서로 분리된다. 이렇게 분리된 DNA는 모세관의 말단 부분에서 형광신호를 공초점현미경을 통해 검출 하게 된다. 모세관 전기영동 칩은 보통 십자모양(+)으로 되어 있으며 모세관의 넓이가 좁아 나노리터 단위의 양의 샘플로도 높은 증폭산물 분리 효율의 장점을 갖는다.

2) 마이크로어레이 (Microarray)

DNA의 혼성화를 이용하여 병원균의 유전자를 검출하는 방법으로 미세제조 기술을 통해 다수의 특정 병원균에 상보적인 DNA 염기순서를 갖는 올리고핵산 탐침을 좁은 면적의 칩 위에 집적시켜, 다량의 병원균 검출을 가능하도록 하는 기술이다. 마이크로어레이 칩은 다수의 형광 패턴을 형성하여 다중검출을 필요로 하는 분야에 유용한 기술이나 검출 시 혼성화가 이루어지는 시간이 길고 고감도의 형광스캐너와 분석법을 필요로 하는 단점을 지니고 있다.

3) 면역 크로마토그래픽 스트립

면역 크로마토그래픽 스트립을 이용한 검출 방법은 특별한 검출 기기나 값비싼 장비 필요 없이 타겟 유전

자를 발색 검출하는 방법으로, 의학적 진단 (medical diagnosis)이나 현장진단 (Point-of-care testing), 자가 진단 (home testing) 등에 널리 쓰이고 있다. 면역 크로마그래픽 스트립은 자연스럽게 유체를 전달할 수 있는 용량을 지니고 있는데 첫번째 구성요소인 완충액 주입 패드(buffer loading pad)는 스폰지와 같이 많은 양의 완충액을 함유할 수 있으며 흡수된 완충액은 조금씩 두 번째 구성요소인 결합 패드 (conjugation pad)로 이동하게 되는데 이 결합 패드에는 PCR에 의해 증폭된 DNA가 반응할 수 있는 나노 입자 (주로 항체가 결합되어 있는 금 나노입자를 사용)들이 존재하여 증폭된 DNA와 결합을 하게 된다. 이후 검출을 위해 나노 입자와 결합된 DNA는 생체분자가 고정화되어 있는 다공성 종이막으로 흘러 들어가 포획됨으로써 발색 검출이 가능하다.

4. 통합형 유전자 분석 마이크로 시스템

통합형 유전자 분석 시스템 연구의 목적은 현장에서 얻은 생체 샘플의 유전자 분석을 제한된 마이크로 공간에서 수행하는 데에 있다. 이와 같이 제한된 공간에서의 유전자 분석은 샘플을 처리하는 과정에서 염려되는 샘플의 오염을 방지할 수 있고, 본래 샘플의 생물학적 상태 및 특정 유전자 발현 등을 정확히 파악할 수 있다. 현재 통합형 유전자 분석 마이크로 시스템 연구는 샘플 전처리-PCR 통합 시스템, PCR-검출 통합 시스템의 단계별 통합에 대한 연구로부터 시작되어 샘플 전처리-PCR-검출이 모두 통합된 유전자 분석 마이크로 시스템에 대한 연구로 확장되고 있다. 이들의 온전한 통합을 위해서는 샘플을 각각의 단계 사이에서 운송시키는 구동력이 매우 중요하다.

1) 원심력 구동 통합형 유전자 분석 마이크로 시스템

원심력 구동 기반 시스템은 복잡한 tube 라인 및 값비싼 외부 장치 없이, 회전시킬 수 있는 모터와 플라스틱 재질의 원형 마이크로 디바이스만으로 손쉽게 구축할 수 있다. 최근에는 Micro-milling 기술과 같은 마이크로 제작 기술의 발달로 인해 플라스틱에 유체 운송 채널, valve 시스템을 손쉽게 구축할 수 있고, 회전력의 속도 및 방향과 마이크로 채널 디자인을 통해 유체의 혼합, 분배, 이동을 제어할 수 있다. 또한 원형의 디스크 내에 대칭형으로 동일한 디자인을 갖는 마이크로 채널들을 제작할 수 있어, 한 번에 동일한 반응을 동시에 수행할 수 있다는 장점이 있다. 이처럼 별도의 복잡한 장비 없이 회전력과 마이크로 채널의 디자인을 통해서 유체의 움직임을 제어하는 원심력 구동 방식은 많은 연구진들에게서 휴대용 현장 진단 통합 유전자 분석 마이크로 시스템을 구현하는 적합한 시스템으로 주목 받고 있다.

III. 결론

많은 연구자들이 랩온어칩 기술을 이용해 샘플 전처리, PCR을 이용한 진단, 결과 분석이 하나의 칩 안에 통합된 유전자 분석 마이크로 시스템 제작에 심혈을 기울여왔다. 분자진단의 요소기술을 마이크로 시스템에 구현시키는 것으로부터 시작해 모든 요소기술을 통합시키는 유전자 분석 시스템에 이르기까지 많은 연구 결과물이 보고되었다. 세계 바이오칩 시장규모는 2011년 \$3.9백만에서 2016년 \$9.6백만으로 연평균 19.5%로 전망할 것으로 보이며, 특히 진단 분야는 2010년 \$1백만에서 2011년 \$2백만, 2016년에는 \$4.1백만으로 연평균 28.2%의 고도 성장을 전망하고 있다 (BBC Research). 현재 미국을 중심으로 상용화 된 제품이 출시되고

있으며, 향후에는 더 많은 제품들이 유전자 진단 분야로 투입되어 경쟁할 것으로 예상된다. 보다 진일보된 마이크로 칩 제작의 경제성 확보, 구동기기의 소형화 및 이동성, 유전자 분석의 재현성 향상을 이룬다면 유전자 진단 분야 시장에서 경쟁력을 확보할 수 있을 것이다. 또한 POCT 기기의 임상 사용의 승인을 위해 민감도와 특이도, 사용 및 저장, 사용과 저장의 용이성, 상용화에 적합한 수명 등에 대한 기준을 만족해야 할 것이다.

분자레벨에서 정확한 진단을 가능하게 하는 다양한 분자 진단 검사 기술의 발전은 신속정확한 진단과 진단 기기의 소형화를 가능하게 하여, 개발도상국 등 환경이 열악한 지역, 식품 위생, 가축 전염병 확인, 법의학, 친자확인, 농수산물 이력추적 뿐만 아니라 개인 맞춤형 진단과 치료의 기반을 제공할 것이다.

사사표기

본 논문은 2013년도 미래창조과학부의 재원으로 과학벨트기능지구지원사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (2013K001552).

참고문헌

- 김윤우 외, “현장 진단용 (Point-of care testing, POCT) 마이크로 및 나노 진단센서”, 「(사)한국바이오칩학회」, 14-17.
- 박병현 외 (2013), “유전자 분석 마이크로 통합 시스템 개발”, 「물리학과 첨단기술 SEPTEMBER 2013」
- 서주원, “PCR 기술 및 시장 동향”, 「KISTI MARKET REPORT, 3 (7) : 19-22.
- 안영창 외 (2010), “등온 증폭법과 Real-Time PCR을 이용한 salmonella 검출”, J. Korean Chemical Society. 54 (2) : 215-221.
- C. Zhang et al. (2007), 「Nucleic Acids Research」, 13, 4223.
- S. Park et al. (2011), 「Biotechnology Advances」, 29, 830.
- N. Notomi, et al. (2000), 「Nucleic Acids Res」, 28, E63.
- R. Suzuki, et al. (2006), 「J. Viro. Methods」, 132, 216.
- P.J. Asiello, et al. (2011), 「Lab Chip」, 11, 1420.
- O. Lazcka, et al. (2007), 「Biosens. Bioelectrons」, 22, 1205.
- M. Karle, et al. (2010), 「Lab Chip」, 10, 3284.
- D. Shalon et al. (1996), 「Genome Res」, 6, 639.
- Advanced Drug Delievry Reviews. 62 (4-5) : 449-457.