

특 집

Capillary Electrophoresis on Microchips

노경원, 한종훈

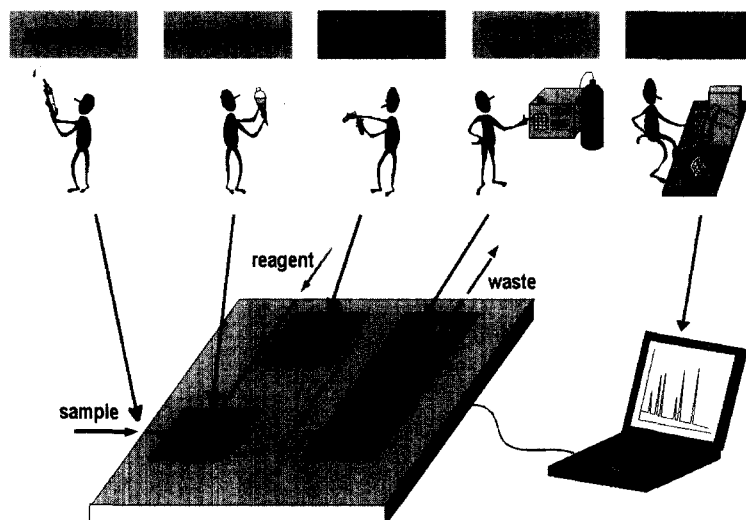
포항공과대학교 화학과

I. 서 론

최근 human genome project의 성공과 조합 화학의 발전에 의해 화학/생물 분야에서는 질병 진단 및 생명과학의 심도 깊은 연구를 위한 생체 활성물질의 신속한 분석, 신약 개발을 위한 수만 종의 화합물에서의 유효 성분의 고속 탐색과 환경오염 물질의 현장 분석 등을 위해 좀 더 빠르고 자동화된 분석 방법과 아울러 현장에서 바로 시료를 분석하여 결과를 얻을 수 있는 고속 분석 시스템의 개발이 요구되고 있다. 이러한 요구에 부응하기 반도체 공정에서 사용되는 미세가공 기술을 이용하여 하나의 작은 칩에서 시료 전처리, 반응, 분리 및 검출 등의 분석과정을 자동화된

방법으로 연속적으로 수행할 수 있도록 제작한 분석 시스템을 lab-on-a-chip 또는 μ -TAS (micro-Total Analysis System)라 하며 이 시스템의 기본 개념은 <그림 1>과 같다^[1]. 이 시스템은 기존의 분석 시스템에 비해 분석에 필요한 시료 및 시약의 양을 마이크로 단위 이하로 줄이고, 시료의 반응 및 분석시간도 대폭 단축시켜 현장에서 미량의 시료만으로도 단시간 내에 연속적으로 분석결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

이와 같은 lab-on-a-chip에 대한 연구는 1990년대 들어 미세 채널이 새겨진 유리판 등에서 모세관 전기이동법(capillary electrophoresis, CE)의 원리를 이용하여 물질을 분리하는 마이크로칩 CE 시스템이 개발됨으로써 활기를 띠기 시



<그림 1> 하나의 칩에서 시료 전처리, 반응, 분리 및 검출들을 순차적으로 수행할 수 있는 lab-on-a-chip의 개념도

작하였고 이후 진정한 lab-on-a-chip 시스템의 개발을 위해 많은 연구가 진행 중이다. 마이크로칩 CE 시스템은 펌프나 밸브 등의 유체 제어장치 없이 전기장만으로 서로 연결된 미세 채널에서 손쉽게 유체 흐름을 제어할 수 있어 비교적 쉽게 시스템 제작이 가능하고, 분리 시간이 짧고 분리능이 뛰어나며, DNA, 단백질 등의 고분자량의 생체 시료부터 약품, 환경물질 및 무기 이온 등의 분석까지 여러 분야의 분석에 응용할 수 있다는 여러 장점이 있다^[2]. 본고에서는 현재 새로운 분석시스템으로 각광 받고 있는 마이크로칩 CE 시스템의 제작 방법, 마이크로칩에서의 유체 제어 및 검출 방법과 집적화된 마이크로칩 시스템에 대해 간략히 소개하고자 한다.

II. 마이크로칩 CE 시스템의 제작

마이크로칩 CE 시스템에서 요구되는 여러 형태의 채널과 미세 구조물들은 반도체 공정에서 사용되는 미세가공기술인 포토리소그래피와 에칭 기술을 주로 이용하여 제작된다. 칩 제작용 재료로는 유리판이나 수정판 및 투명한 플라스틱판 등이 많이 사용되는데 이는 시료 검출을 위해 광학 검출방법이 주로 이용되기 때문이다.

유리 재질의 마이크로칩 제작을 위해서는 유리판에 포토레지스트를 코팅한 후 원하는 디자인의 마스크를 덮고, 노광, 현상 및 에칭 과정을 거쳐 깊이 10~20 μm 의 채널을 유리판에 새긴다. 그리고 용기(reservoir) 부착용 구멍을 뚫은 덮개용 유리판을 채널이 새겨진 판 위에 덮고 밀착시킨 후 500~600°C에서 가열하여 두 판을 접합시킨다. 마지막으로 용액을 담기 위한 유리판이나 플라스틱판을 용기 구멍에 접착제로 붙여 마이크로칩을 완성한다.

플라스틱은 유리 재질의 마이크로칩에 비해 신속하고 저렴하게 보다 복잡한 구조의 칩을 제작할 수 있다는 장점이 있어 최근에는 여러 가지 재질의 플라스틱으로 칩을 제작하려는 연구가 많

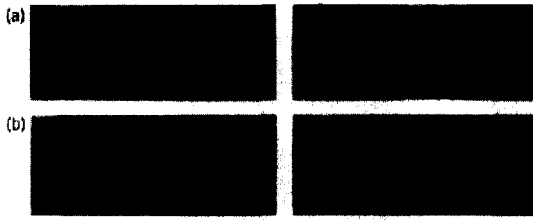
이 진행중이다^[3]. 마이크로칩 제작에 많이 사용되는 플라스틱으로는 polymethylmethacrylate (PMMA), polyethylene(PE), polystyrene (PS), polycarbonate(PC) 및 poly(dimethylsiloxane) (PDMS) 등이다. 특히 PDMS는 replica molding 방법으로 쉽고 빠르게 칩 제작이 가능하며, 광학적으로 230 nm까지 투명하며, 다른 재료와 밀착성이 좋으며 표면 산화를 통해 유리판이나 다른 PDMS판 등에 비가역 접합이 가능하다는 여러 장점이 있어 여러 플라스틱 재료 중에서 마이크로칩 제작에 가장 많이 사용되고 있다.

본 연구실에서 수행하는 PDMS 재질의 마이크로칩 제작 공정은 다음과 같다. 즉, 실리콘웨이퍼에 두꺼운 포토레지스트(SU-8)을 원하는 높이로 코팅한 후 마스크를 덮고 노광, 현상하여 양각의 구조물이 새겨진 틀을 제작한다. 이 틀에 PDMS prepolymer를 붓고 75°C에서 3시간 정도 가교결합을 시킨 후 틀에서 떼어내면 원하는 채널이 새겨진 PDMS 판을 얻게 된다. 이 판에 다른 PDMS 판이나 유리판을 덮어 칩을 완성하는데 이때 각 판들의 표면을 산화시킨 후 접합하면 두 판이 떨어지지 않는 비가역적으로 접합된 마이크로칩을 얻을 수 있다. 표면 산화 방법으로는 일반적으로 plasma cleaner에서 산화시키는 방법이 많이 사용되지만, 본 연구실에서는 보다 저렴하고 신뢰성이 높은 접합방법으로 Tesla 코일에서 발생하는 corona 방전으로 PDMS 표면을 산화시킨 후 비가역 접합을 수행하는 방법을 개발한 바 있다^[4].

III. 마이크로칩에서의 유체 흐름 제어 및 검출 방법

1. 유체 흐름 제어 및 시료 주입 방법

마이크로칩 CE 시스템에서는 혼합물을 분리하고, 유체 흐름을 제어하기 위해 전기삼투흐름(electroosmotic flow)을 이용한다. 전기삼투흐름은 완충용액으로 채워진 채널의 양단에 전기

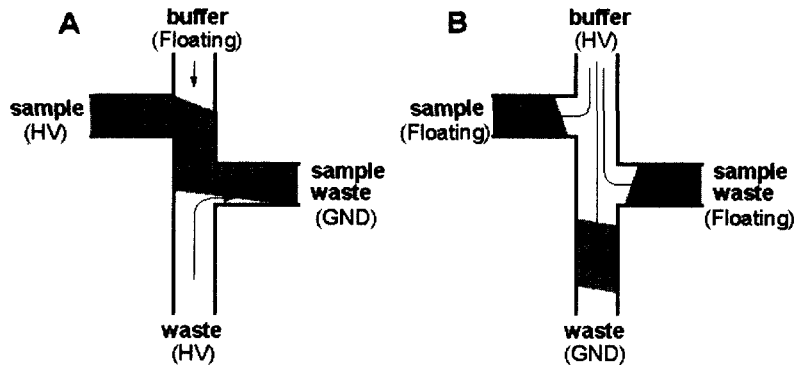


〈그림 2〉 (a) 전기삼투흐름과 (b) 압력에 의한 흐름 형태 비교. $t=0\text{ms}$ 와 $t=165\text{ms}$ 에서의 fluorescein dextran의 이동 모습.

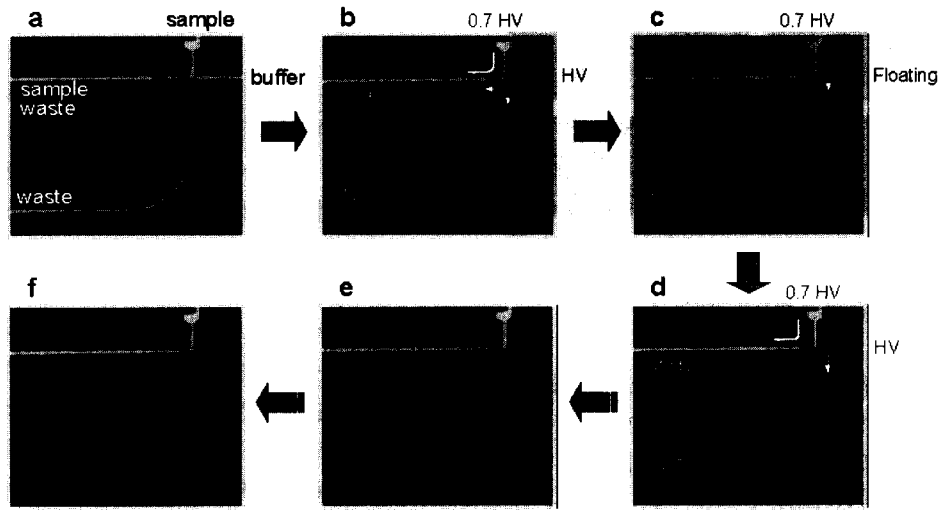
장을 가할 때 생기는 유체의 흐름으로 소형화된 액상 분리 시스템에서 다음과 같은 매우 유용한 특징들을 가지고 있다. 첫째, 압력차에 의한 일반적인 유체역학적인 흐름의 경우 채널 단면의 중심에서 유속이 가장 빠르고 채널의 벽으로 갈수록 점차 유속이 느려지는 포물선 형태의 유속 분포를 가지지만, 전기삼투흐름은 채널 전체에 대해 거의 동일한 유속을 갖는 plug 형태의 유속 분포를 가지므로 띠 넓힘 현상이 적어 분리가 높다 〈그림 2〉. 둘째, 서로 연결된 채널 네트워크에서 각 채널의 전기장의 세기는 전기적 네트워크에서의 저항의 연결과 유사하게 Kirchoff의 법칙을 따르기 때문에 각 채널에서의 유체 흐름은 단순히 적당한 전기장만을 가해줌으로써 정확히 제어할 수 있다. 결과적으로 펨토리터~나노리터 정도로 매우 적은 부피를 갖는 시료도 다른 유체 제어장치(펌프나 밸브 등)를 사용하지 않고도 전

기장만으로 그 흐름을 제어할 수 있다는 장점이 있다.

마이크로칩 CE 시스템에서는 시료 주입 장치를 칩에 통합시켜 각 채널에 가하는 전기장을 조절함으로써 시료 주입을 수행한다. 분리 채널에 시료를 주입하기 위한 대표적인 채널 구조는 double-T 구조와 십자형 구조이다. Double-T 구조는 〈그림 3〉과 같이 칩 내에 일정 부피의 시료 채널이 있어 항상 일정한 양의 시료를 재현성 있게 주입할 수 있다는 장점이 있다. 십자형 구조는 분리용 채널과 주입용 채널이 서로 수직하게 교차하는 형태로서, 이 구조에서의 시료 주입 방법은 pinched 주입방법과 gated 주입방법으로 나눌 수 있다. Pinched 주입 방법은 시료 플러그의 공간 퍼짐을 최소화 시켜 매우 높은 재현성으로 시료를 주입할 수 있는 방법으로 〈그림 3〉과 유사한 전압구성을 이용하여 시료를 주입한다. 이 방법에 의해 주입되는 시료의 양은 주입 시간, 시료의 전기 이동도와 관계없이 일정하다. Gated 주입방법은 완충용액 용기의 전압을 짧은 시간동안 제거함으로써 분리용 채널에 시료를 주입하는 방법이다 〈그림 4〉. 이때 주입되는 시료의 양은 전기장을 걸어주는 시간과 전기장의 세기에 좌우된다. 〈그림 4〉는 gated 주입 방법으로 시료를 주입하여 두 가지 물질이 분리 채널을 지나면서 분리되는 모습을 보인 것이다.



〈그림 3〉 Double-T 구조의 시료 주입 장치. (A) 시료 주입시의 전압 구성 및 용액 흐름. (B) 시료 주입시의 전압 구성 및 용액 흐름.



〈그림 4〉 Gated 주입 방법에 의한 시료 주입 및 시료 분리 모습. (a) 모든 채널에 형광 시료를 채웠을 때의 모습 (b) 시료 주입 전 (c) 시료 주입 순간 (d-e) 주입된 시료가 분리 채널에서 이동하는 모습 (f) 시료가 채널에서 분리되는 모습. 형광 시료: fluorescein, fluorescein isothiocyanate (FITC).

2. 검출 방법

1) 레이저유발형광 검출법

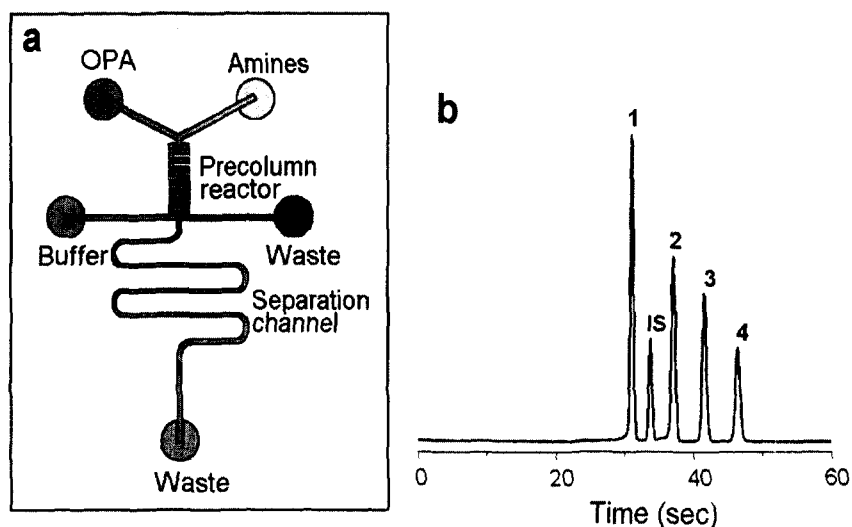
마이크로칩 CE 시스템에서 주입되는 시료 양은 10~100 피코리터 정도로 매우 적기 때문에 효과적으로 시료를 검출하기 위해서는 감도가 뛰어난 검출 방법이 요구된다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 검출 방법중의 하나는 레이저 광원을 이용한 레이저유발형광법이다. 레이저유발형광 검출법은 감도가 뛰어나 극미량 시료 검출에 적합하지만, 광원의 파장이 한정되어 있고 직접 검출할 수 있는 시료의 종류에 제한이 있다. 따라서 직접 검출이 어려운 시료의 경우 시료 분리 전 또는 분리 후에 형광 발색단을 결합시키는 과정이 요구된다.

본 연구실에서는 시료의 레이저유발형광 검출을 위해 〈그림 5-a〉와 같이 반응기와 분리 채널이 통합된 마이크로칩을 제작하여 형광 유도체화 반응 및 분리, 검출을 연속하여 수행한 바 있다^[4]. 이 연구에서는 칩에 통합된 precolumn 반응기에서 biogenic amine을 형광 발색시약인 o-phthaldialdehyde(OPA)와 반응시켜 형광

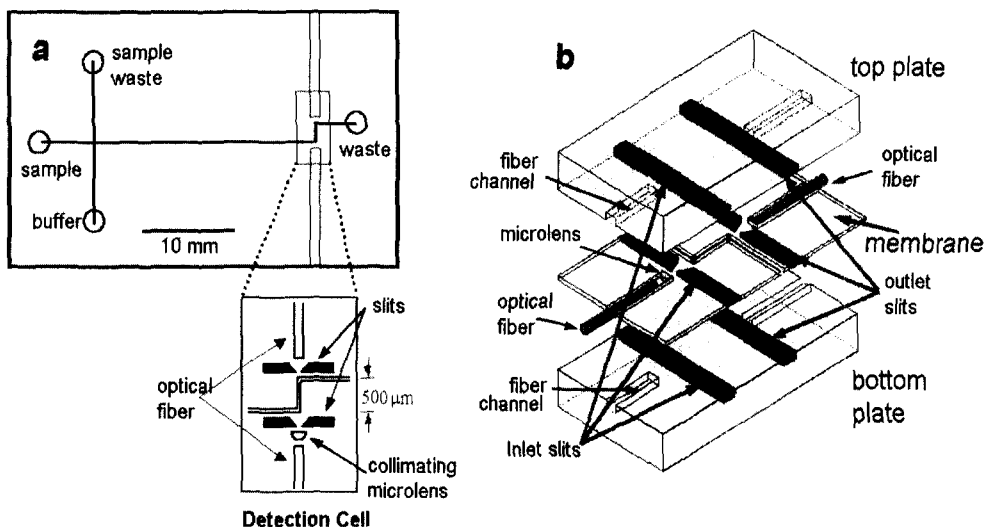
유도체를 만든 후 분리 채널에서 OPA-amine을 분리 검출하였으며, 1분 이내에 반응 및 분리를 완료할 수 있었다 〈그림 5-b〉.

2) 흡광 검출법

흡광 검출법은 응용 범위가 넓고 시료 유도체화 등의 전처리 과정이 거의 필요 없어 기존의 분석장치에서 널리 사용되고 있는 검출법 중의 하나이다. 그러나 마이크로칩 CE 시스템에서는 채널의 깊이 및 폭이 50 μm 정도 내외이므로 광경로길이가 짧아 흡광 검출 감도가 낮다는 문제가 있었다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 본 연구실에서는 〈그림 6〉과 같이 검출셀을 Z-모양으로 설계하여 광경로길이를 길게 함으로써 10배 이상 검출 감도가 향상된 PDMS 재질의 흡광 검출 시스템을 개발하였다^[5]. 또한 이 연구에서는 광섬유로부터 나온 빛을 집광하여 검출셀로 보내주는 마이크로 렌즈와 제대로 검출셀을 통과하지 못한 빛이 검출기로 들어가는 것을 막아주는 슬릿을 칩 내부에 통합시킨 흡광 검출 시스템을 개발함으로써 향상된 직선성과 아울러 보다 효과적인 고감도 흡광 검출을 수행할 수 있었다.



〈그림 5〉 (a) Precolumn 반응기와 분리 채널이 통합된 형광검출용 마이크로칩. (b) 마이크로칩을 이용한 OPA-bio-genic amine의 분리 결과. 피크 1: histamine, 2: tyramine, 3: putrescine, 4: tryptamine, IS (internal standard): dansylhydroxide.



〈그림 6〉 (a) Z-형태의 검출셀과 collimating 시스템이 통합된 흡광 검출용 마이크로칩. (b) 3층 구조의 collimated 흡광 검출 시스템.

3) 기타 검출법

레이저유발형광 검출법은 감도는 좋지만 아직까지는 분석시스템의 크기가 마이크로칩 보다 훨씬 크다는 문제가 있어 휴대할 수 있는 분석시스템 개발에 걸림돌이 되고 있다. 이에 반해 마이크

로칩에 전기화학 검출법을 이용할 경우 작은 크기로 분석시스템 제작이 가능하며 고감도 분석이 가능하다는 장점이 있다¹⁶⁾. 전기화학 검출은 일반적으로 마이크로칩의 분리 채널 말단과 미세 전극을 접촉함으로써 이루어지며, 그 응용 분야도

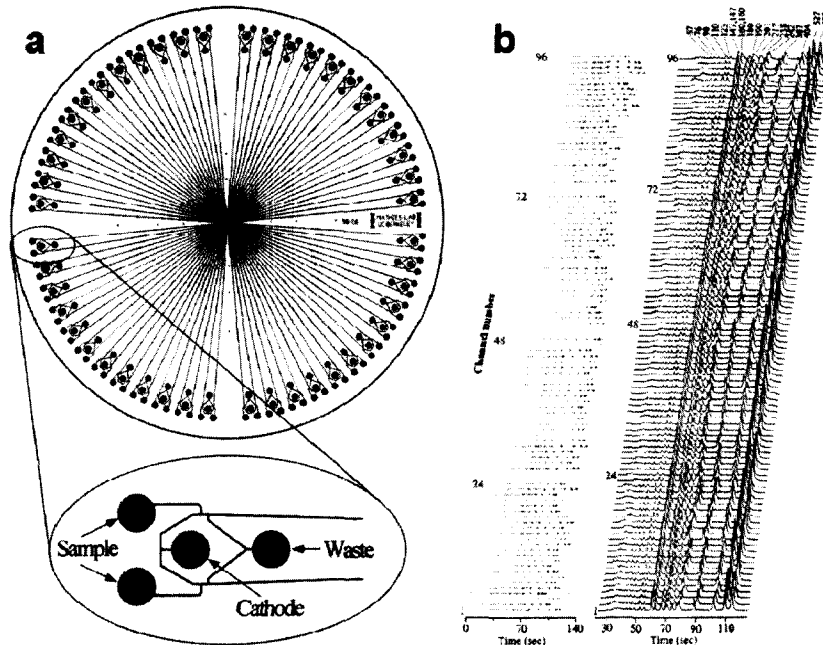
DNA, 단백질과 같은 생체 물질과 무기 이온, 생리활성 물질 검출 및 환경오염 물질과 생화학 무기 탐지 분야 등으로 응용 범위를 넓혀 가고 있다.

또한 질량분석법도 마이크로칩의 새로운 검출 방법으로 각광을 받고 있다. 질량분석법은 특히 단백질과 같은 고분자 생체 시료의 분자량 확인 및 구조 분석에 있어서는 필수적인 분석법으로, 최근에는 마이크로칩 CE 시스템과 전자분무이온화/질량분석기를 직접 연결하여 마이크로칩에서 분리한 시료를 질량분석기로 검출하는 연구가 많이 보고되고 있다. 그러나 생체시료를 질량분석기로 검출하기 위해서는 시료 중에 존재하는 무기이온과 같은 불순물을 제거하는 전처리 과정이 필수적으로 요구된다. 본 연구실에서는 laminar flow에서의 분자 확산을 이용한 전처리용 마이크로칩을 개발하여 투석막을 이용할 때 약 2시간 걸리는 전처리 과정을 단 1초만에 수행할 수 있음을 보인다^[7].

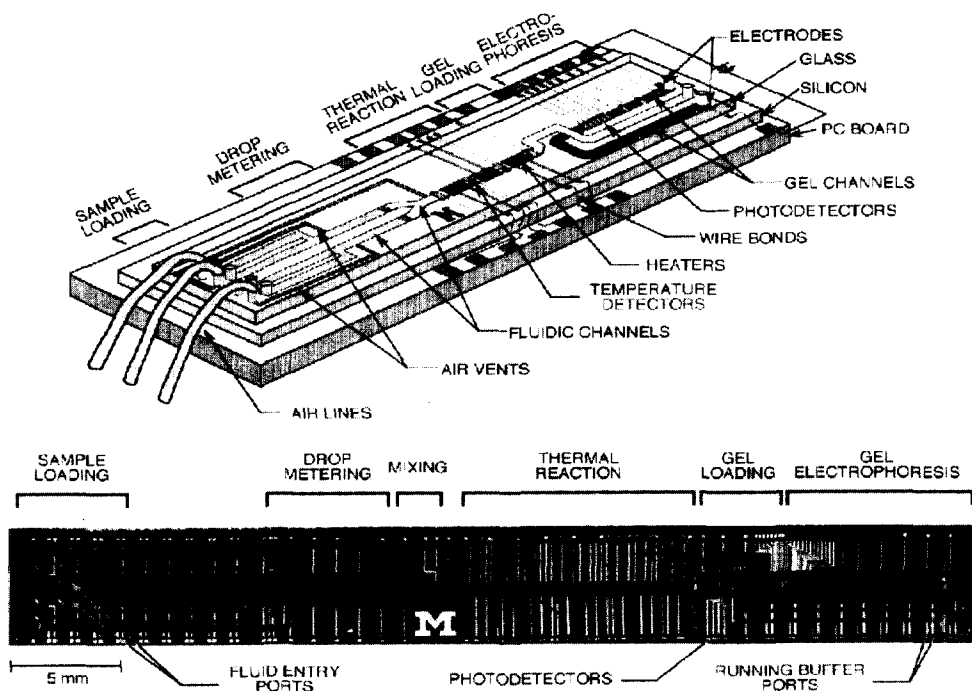
IV. 집적화된 마이크로칩

1. 다채널 동시 분석 시스템

마이크로칩 CE 시스템은 분리능 저하없이 분석에 필요한 시간을 크게 줄일 수 있고, 한번에 여러 채널에서의 동시 분석이 가능하다는 장점이 있어, DNA, 단백질 분석 및 신약 탐색 분야와 같이 다양한 시료의 신속하고 정확한 분석이 절대적으로 요구되는 연구 분야에서 가장 많이 활용되고 있으며, 또한 앞으로 그 중요성이 더욱 커질 것으로 기대된다. 다채널 동시 분석의 예로서 Shi 등은 <그림 7>과 같이 둥근 유리 웨이퍼에 96개의 분리 채널을 원형으로 새기고 여기에서 96개의 DNA 시료를 3분 내에 동시에 분석할 수 있음을 보인 바 있다^[8]. 또한 이들은 96-well의 microtiter plate로부터 모세관을 통해 각 well의 시료를 칩에 동시에 주입하여 각 시료를 동시 분석함으로써 완전 자동화된 고속, 고효율 분석



<그림 7> (a) 96개의 서로 다른 DNA 시료를 동시에 분리, 검출할 수 있는 96 채널의 원형 마이크로칩. (b) 96 채널에서의 DNA 분석 이미지와 분리 결과.



〈그림 8〉 나노리터 부피의 시료 주입장치, 혼합기, 온도 설정이 가능한 반응기, CE 분리 시스템 및 형광 검출기가 집적된 DNA 분석용 마이크로칩.

시스템의 실현이 가능함을 보였다.

V. 결론 및 전망

2. 집적화된 분석 시스템

이상적인 lab-on-a-chip 시스템을 구현하기 위한 노력으로 실제로 하나의 마이크로칩에 분석에 필요한 여러 장치들을 집적시킨 분석시스템의 개발이 진행되고 있다. 일례로 Burns 등은 세포에서 DNA를 추출한 다음, DNA 증폭 과정을 거쳐 형광 유도체 반응을 수행하고 분리, 검출하는 일련의 과정을 하나의 칩에서 구현함으로써 진정한 lab-on-a-chip의 실현 가능성을 제시하였다 <그림 8>^[9]. 이러한 집적화된 분석시스템은 휴대가 가능하며 신속한 분석 결과를 얻을 수 있으므로 개인용 고속 의료 진단 기기 및 유전자 조작 농산물 실시간 검사 장비, 또는 환경 오염 물질 모니터링 장비로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

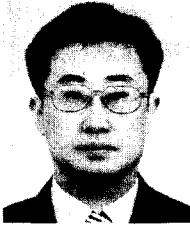
본 고에서는 lab-on-a-chip의 한 분야로서 고속, 고효율의 분석을 수행할 수 있는 마이크로 칩 CE 시스템의 원리와 제작 방법, 마이크로 채널에서의 유체 제어 및 검출 방법과 아울러 집적화된 마이크로칩 시스템의 연구 성과들을 중심으로 간략히 소개하였다. 앞서 기술한 바와 같이 마이크로칩 CE 시스템은 생의학, 신약 탐색 및 환경 등의 여러 연구분야에서 적은 양의 시료를 사용하여 신속하게 분석할 수 있는 분석 시스템의 필요성과 부합하여 매우 빠른 진보가 이루어지고 있으며, 이 결과 미세 채널, 소형 반응기 및 검출 장치 등의 통합과 자동화 시스템에 의해 나노리터 이하의 시료만으로도 높은 효율로 매우 빠른 시간 내에 분석을 수행하는 것이 가능해지고 있다.

그러나 마이크로칩 CE 시스템 및 lab-on-a-chip이 실용화되어 널리 보급되기 위해서는 해결해야 할 문제들이 아직 많이 남아 있다. 즉 마이크로칩과 다른 장비들과의 연결문제, 여러 시료들을 동시에 분석할 수 있는 동시 다분석의 실용화, 다양한 검출법 개발 및 시스템의 집적화 등은 계속 연구하여 해결해야 할 과제이다. 또한 마이크로칩에 기반을 둔 분석 시스템을 누구나 간편하게 사용할 수 있는 시스템으로 만들기 위해서는 이 시스템들을 적은 비용으로 대량 생산할 수 있어야 할 것이다. 만약 이러한 모든 노력들이 실현된다면 lab-on-a-chip이 많은 연구 분야 및 일상 생활에 커다란 영향을 미칠 것으로 기대되며 머지 않아 우리는 임상 진단 장비나 환경오염물질 분석 장비들을 휴대하고 다니면서 사용할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- [1] S. C. Jakeway, A. J. de Mello, E. L. Russell, "Miniaturized Total Analysis Systems for Biological Analysis," *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 525-539, 2000.
- [2] G. J. M. Bruin, "Recent Developments in Electrokinetically Driven Analysis on Microfabricated Devices," *Electrophoresis* 21, 3931-3951, 2000.
- [3] H. Becker, C. G. rtner, "Polymer Microfabrication Methods for Microfluidic Analytical Applications," *Electrophoresis* 21, 12-26, 2000.
- [4] K. W. Ro, K. Lim, H. Kim, J. H. Hahn, "PDMS Microchip for Precolumn Reaction and Micellar Electrokinetic Chromatography of Biogenic Amines" in *Proceedings of the μ TAS 2001 Symposium* J. P. Ramsey, A. van den Berg (Eds) Kluwer Academic Publishers, pp.561-562, 2001.
- [5] K. W. Ro, B. C. Shim, K. Lim, J. H. Hahn, "Integrated Light Collimating System for Extended Optical-Path-Length Absorbance Detection in Microchip-Based Capillary Electrophoresis" in *Proceedings of the TAS 2001 Symposium* J. P. Ramsey, A. van den Berg (Eds) Kluwer Academic Publishers, pp.274-276, 2001.
- [6] N. A. Lacher, K. E. Garrison, R. S. Martin, S. M. Lunte, "Microchip Capillary Electrophoresis/Electrochemistry," *Electrophoresis* 22, 2526-2536, 2001
- [7] Y. C. Kim, K. W. Ro, N. Park, J. H. Hahn, "Rapid Sample Cleanup Microchip for Protein Analysis by Electrospray Ionization Mass Spectrometry" in *Proceedings of the μ TAS 2001 Symposium* J. P. Ramsey, A. van den Berg (Eds) Kluwer Academic Publishers, pp. 123-124, 2001.
- [8] Y. Shi, P. C. Simpson, J. R. Scherer, D. Wexler, C. Skibola, M. T. Smith, R. A. Mathies, "Radial Capillary Array Electrophoresis Microplate and Scanner for High-Performance Nucleic Acid Analysis," *Anal. Chem.* 71, 5354-5361, 1999.
- [9] M. A. Burns, B. N. Johnson, S. N. Brahmasandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, et al., "An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device," *Science* 282, 484-487, 1998.

저자 소개



魯庚元

1965년 12월 17일생, 1988년 2월 서울대학교 공업화학과 (학사), 1990년 2월 서울대학교 공업화학과 (석사), 2002년 2월 포항공과대학교 화학과 (박사), 1990년 1월~1996년 7월 : (주)태평양 기술연구원, 1997년 1월~1998년 2월 : (주)영린기기, <주관심 분야 : Lab-on-a-Chip, CE, 생의학/환경 분석>



韓宗勳

1956년 8월 14일생, 1979년 2월 부산대학교 화학과(학사), 1981년 2월 한국과학기술원 화학과(석사), 1988년 10월 Stanford University 화학과 (Ph. D.), 1988년 10월~1990년 1월 : 미국 Los Alamos 국립연구소 연구원, 1990년 2월~현재 : 포항공과대학교 화학과 부교수, <주관심 분야 : Lab-on-a-Chip, DNA Chip, CE, Single-DNA Manipulation/Analysis Techniques, Probing Protein Structures by Mass Spectrometry, Study of Biomembranes by Nonlinear Optics>