

미소유체 칩 상에서 Quantum Dot 및 마이크로 비드를 이용한 생체물질 분석

윤광석[†] · 이도훈* · 김학성* · 윤의식

Microbead-based bio-assay using quantum dot fluorescence in a microfluidic chip

Kwang-Seok Yun[†], Dohoon Lee*, Hak-Sung Kim*, and Euisik Yoon

Abstract

We present a microfluidic chip designed for the detection of antibody by using quantum dots fluorescence and a microbead-based assay. A custom designed PDMS microfluidic chip with multi-layer channel is utilized for capturing microbeads; antibody injection into each micro-well; QD injection; and fluorescence detection. The experiment using the fabricated microfluidic chip has been performed on solutions with various concentrations of antibody and has shown correlated fluorescent intensities.

Key Words : antibody, microbead, quantum dot, microfluidics, MEMS

1. 서 론

단백질, DNA 등의 생체 물질 검출은 최근 바이오 기술의 발전과 생명공학에 대한 관심의 증가와 더불어 많은 기술개발이 이루어지고 있다^[1,2]. 특히 최근들어 Quantum dot (QD)을 이용하여 항체, DNA 등의 생체 물질을 검출하는 연구가 많이 진행되고 있다^[3-6]. QD은 기존의 유기 발광체에 비해 감도가 높고, 넓은 파장 대역에서 여기되고 좁은 파장대역의 빛을 방출하며, 장시간 발광시에도 안정적인 특성을 보이며, 또한 다양한 색을 내는 QD의 제작이 용이하다는 장점을 가지고 있다. 본 논문에서는 반도체 MEMS 공정을 이용하여 제작된 미소유체 칩 상에서, 마이크로 비드와 QD를 이용하여 특정 항체를 검출한 연구 결과를 보여준다.

마이크로 비드는 미소유체 칩 상에서 조작이 비교적 용이하며 표면 처리를 통하여 다양한 생체분자들의 결합

을 유도할 수 있다는 장점으로 인하여 지금까지 많은 연구결과들이 발표되었다^[5-12]. 본 연구에서는 마이크로 비드의 표면 처리를 통하여 특정항체와의 반응을 유도 검출할 수 있도록 하였다. 또한 높은 감도를 얻기 위하여 기존의 유기 발광물질이 아닌 QD를 사용하였으며, 이러한 모든 검출과정은 비드조작의 편이성과 고 감도 측정을 위하여 미소유체 칩상에서 이루어진다.

2. 마이크로 비드 기반의 분석을 위한 미소유체 칩

2.1. 미소유체 칩의 구조 및 동작

MEMS 공정을 이용한 미소유체 칩을 사용할 경우, 단일 비드의 제어가 용이하여, 분석을 위한 용액의 부피가 작게 되어 상대적으로 높은 감도의 측정이 가능하다는 장점이 있다. 다음 그림 1은 단일 비드를 이용하여 생체 분자를 분석하도록 제안된 미소유체 칩의 구조 및 그 동작을 보여준다. 그림에서 보듯이 제안된 칩은 하나의 비드를 가둘수 있는 마이크로 챔버 부분과 그 양쪽을 막아주는 밸브부분, 그리고 밸브를 열고 닫아주는 밸브제어 채널로 구성된다. 동작을 살펴보면, 먼저 입구 (Inlet)를 통하여 마이크로 비드가 포함된 용

한국과학기술원 전자전산학과(전기 및 전자공학 전공)(Department of Electrical Engineering and Computer Science (Division of Electrical Engineering))

*한국과학기술원 생명과학과(Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST))

[†]Corresponding author: ksyun72@bclinc.com

(Received : January 14, 2005, Accepted : June 5, 2005)

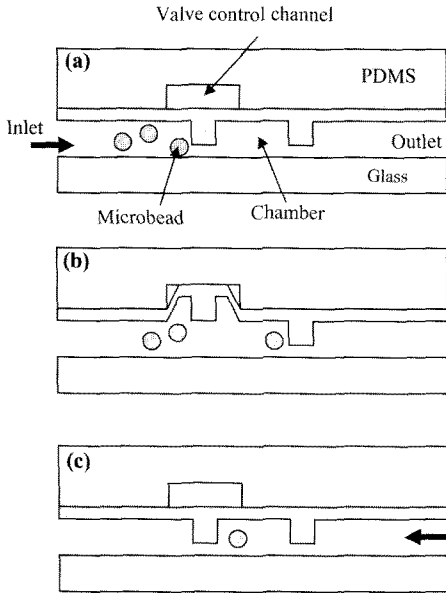


그림 1. 미소유체 칩을 이용하여 단일 비드를 포획하는 개념도; (a) 마이크로 비드 주입, (b) 밸브 열기. 단일 비드 챔버내로 이동, (c) 밸브 닫으며 단일비드 포획

Fig. 1. Schematic view of each status for the capturing of single microbeads; (a) Beads introduction, (b) Valve open, and (c) Valve close/single bead capturing.

액을 흘려준다. 이때 밸브가 닫혀 있으므로 챔버내로 비드들이 유입되지 않는다. 이때 그림 1(b)와 같이 밸브를 열어주어 챔버내로 하나의 비드를 넣어준다음 밸브를 닫는다. 마지막으로 출구 (Outlet)쪽에서 용액을 밀어주게 되면 챔버에 갇힌 하나의 비드를 제외한 다른 비드들은 다시 입구쪽으로 빠져나가게 됨으로써 하나의 비드를 챔버내로 잡아주게 된다.

2.2. 칩 제작

제안된 미소유체 칩은 그림 1에서 보는 바와 같이 유리기판에 두층의 polydimethylsiloxane (PDMS)가 결합된 형태로 이루어졌다. 그림 2는 칩의 제작공정을 나타낸다. 먼저 상층 PDMS 구조를 제작하기 위하여, 실리콘 기판위에 SU-8 (Microchem Co.)을 패터닝한다. 다음 PDMS와 분리를 쉽게 하기 위해 실리콘 기판 및 SU-8 틀의 표면에 진공증착법을 이용하여 tridecafluoro-(1,1,2,2-tetrahydrooctyl)-1-trichlorosilane (United Chemical Technology, Inc.)을 self-assembled-monolayer (SAM)로 코팅해 준다. 그리고 PDMS prepolymer (Sylgard 184, Dow Corning Co.) 용액을 적당한 두께로 위쪽에 붓고

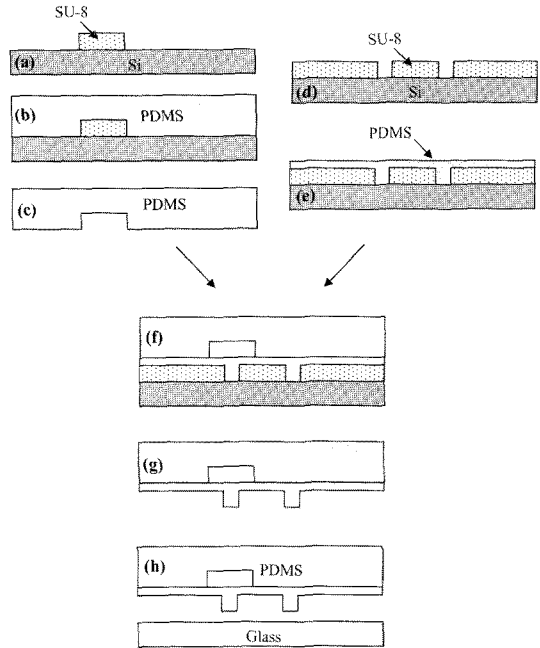


그림 2. 칩 제작과정; (a) 상판 PDMS구조체를 위한 SU-8 mold형성. (b) PDMS를 붓고 굳힌다. (c) PDMS를 기판으로부터 떼어낸다. (d) 아래층 PDMS 막을 위한 SU-8 mold 형성. (e) PDMS를 spin coating 한다. (f) 제작된 상판 PDMS와 아래층 PDMS막을 정렬하여 접촉한다. (g) PDMS 결합 구조체를 기판으로부터 떼어낸다. (h) PDMS 구조체를 유리 기판과 접촉한다.

Fig. 2. Fabrication process; (a) SU-8 mold patterning for top PDMS plate. (b) PDMS pouring and curing. (c) Peel off from mold. (d) SU-8 mold patterning for bottom PDMS membrane. (e) PDMS spin coating and curing. (f) Bonding of top and bottom PDMS plates. (g) Peel-off of bonded PDMS layer from substrate. (h) Bonding with glass substrate.

진공 챔버를 이용하여 기포를 제거한다. 마지막으로 80 °C의 오븐에서 1시간동안 굳힌다음 떼어내면 된다. 아래층 PDMS 구조도 비슷한 방식으로 제작되는데, 먼저 실리콘 기판위에 SU-8을 5 μm 두께로 코팅한 다음 UV 노광을 하여 밸브부분을 형성시킨다. 이 상태에서 현상액에 현상하지 않고 두번째 SU-8을 약 30 μm 두께로 코팅한 다음 UV 노광을 하여 비드들이 지나가게 될 채널부분을 형성해 준 다음 현상액을 이용하여 한꺼번에 두층의 SU-8을 모두 패터닝한다. 다음으로 기판의 표면을 SAM 코팅하고, 얇은 PDMS 막의 형성을 위하여 PDMS prepolymer를 약 60 μm 두께로 스핀 코팅하고 굳히게 된다. 이렇게 제작된 상층, 하층 PDMS

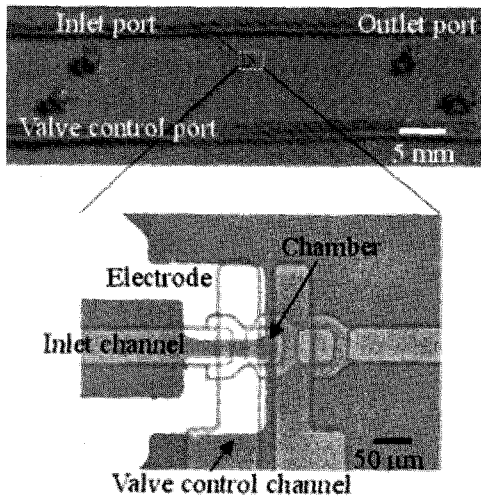


그림 3. 제작된 미소유체 칩의 전체 사진 및 확대된 현미경 사진
 Fig. 3. Photograph of the fabricated microfluidic chip and magnified view.

구조는 산소 플라즈마를 이용하여 표면을 개질한 다음 서로 접합을 한 뒤, 기판으로부터 떼어내게 된다. 마지막으로, 결합된 PDMS의 아래면을 산소 플라즈마 처리한 뒤 유리 기판과 접합을 함으로써 원하는 미소유체 칩을 제작한다.

다음 그림 3은 제작된 칩의 전체 사진 및 확대된 사진이다. 제작된 칩은 비드와 용액이 들어가고 나가게 되는 입구와 출구 그리고 밸브를 제어하기 위한 밸브 제어 포트가 있다. 확대된 사진에서 보면, 가운데 가로 세로 각각 50 μm 크기의 챔버가 있으며 그 양쪽에 밸브 역할을 하는 구조체가 형성되어 있다. 백금으로 제작된 전극은 PDMS와 기판의 접착력을 약화시켜 밸브의 열림동작을 용이하게 한다.

3. 실험

다음 그림 4는 제작된 칩을 이용하여 실험하는 과정을 보여준다. 2장에서 설명한 바와 같이, 입구를 통하여 마이크로 비드가 포함된 용액을 흘려주며, 밸브동작을 이용하여 하나의 비드를 마이크로 챔버내로 잡는다. 본 실험에 사용한 마이크로 비드는 streptavidin이 코팅된 지름 10 μm의 polystyrene 비드이다. Human IgG 항체의 특이결합을 위하여 비드 표면을 protein-A로 코팅을 한 다음, PBS 용액을 버퍼 용액으로 사용하여 실험하였다. 마이크로 비드를 잡은 뒤, human IgG 항체를 입구를 통하여 흘려주었다. 본 실험에서는 5개의 칩

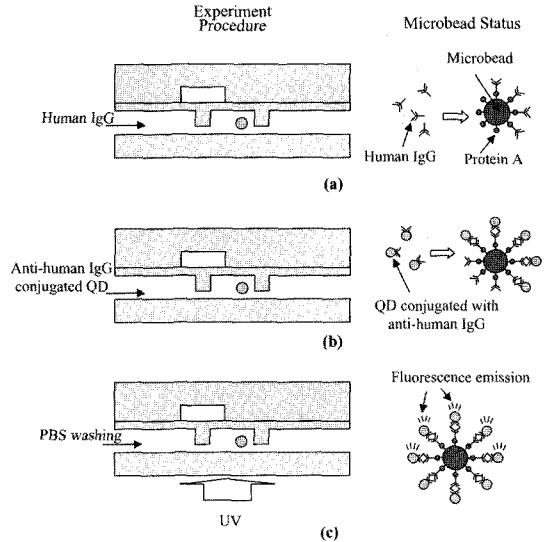


그림 4. 실험 과정 및 각 단계에서 마이크로 챔버내에 있는 비드의 상태; (a) 비드 포획 및 human IgG 항체 주입, (b) PBS를 이용하여 washing 후 anti-human IgG와 결합된 QD 주입, (c) PBS를 이용하여 washing 후 형광측정

Fig. 4. The experimental procedure and each status of microbead in micro-well; (a) Human IgG injection after bead capturing, (b) Anti-human IgG conjugated QD injection after washing, and (c) Washing with PBS and fluorescence detection.

을 사용하여 0, 0.01, 0.1, 1, 그리고 10 μg/mL의 서로 다른 농도의 항체를 각각 30분간 흘려주었다. 다음으로 PBS 용액을 이용하여 충분히 린스를 해준 뒤, 5 nM의 QD 용액을 흘려주었다. 이때 사용한 QD는 human IgG 항체와의 결합을 위하여 anti-human IgG 항체와 결합된 형태이다. 30분의 결합시간 뒤, 채널 및 비드의 표면을 PBS를 이용하여 충분히 린스하였다.

측정을 위하여 형광현미경 (IX71, Olympus Co.)을 이용하였으며, QD의 여기를 위한 파장은 400 nm, 그리고 방출 파장은 605 nm를 사용하였다. 마이크로비드의 형광은 현미경에 탑재된 CCD 카메라를 이용하여 캡처한 다음 프로그램을 이용하여 평균 밝기를 수치적으로 추출하였다.

4. 결과 및 고찰

다음 그림 5는 여러가지 농도의 항체에 대하여 실험한 결과로서, 각각 마이크로 챔버부분의 가시광 영상과 형광 영상을 보여준다. 가시광 사진에서 볼 수 있듯이,

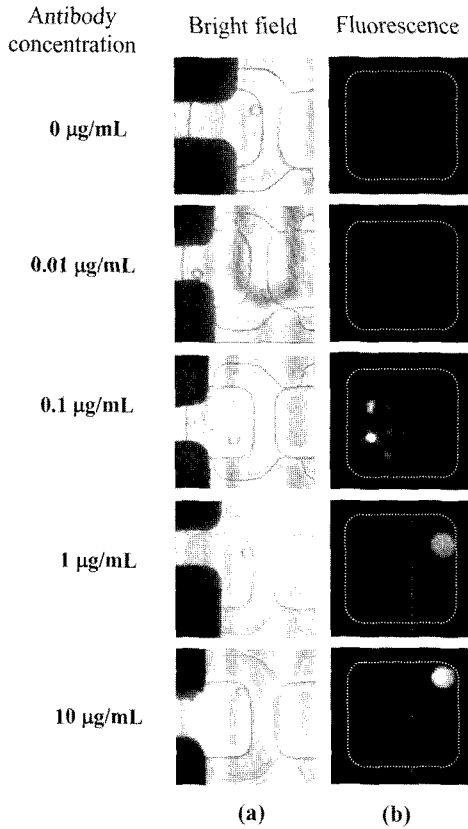


그림 5. 실험 결과; (a) 챔버내에 포획된 마이크로 비드의 현미경 사진, (b) 여러가지 농도의 항체에 대한 형광 현미경 사진
 Fig. 5. Experimental results; (a) Fluorescence images for various concentrations of antibodies and (b) Visible (not fluorescence) image according to each microbead in (a).

10 µm 크기의 마이크로 비드가 각각의 마이크로 챔버 (50 µm × 50 µm × 30 µm)내에 잘 잡혀있음을 알수 있다. 또한 형광 사진을 보면, 항체를 흘려주지 않은 경우 비드에서 나오는 신호와 백그라운드 신호가 거의 차이가 없는 것으로보아, 비드표면에 QD/anti-human IgG 결합물의 비특이성 흡착 (non-specific binding)이 거의 나타나지 않았음을 알수 있다. 실험결과 항체농도 0.1 µg/mL부터 비드의 형광을 관찰할 수 있으며, 항체 농도가 높을수록 더 밝은 빛을 내는 것을 볼수 있다. 그림 6은 그래픽 소프트웨어를 이용하여 비드가 내는 평균 형광 밝기의 정규화 값을 표시한 그래프이다. 그래프에서 보면, 항체 농도 0.1 µg/mL의 측정값에서 낮은 값을 보이고 있는데, 이는 마이크로챔버내에 비드와 같이 잡힌 시럼 (serum) 성분의 물질들로 인해 비드와

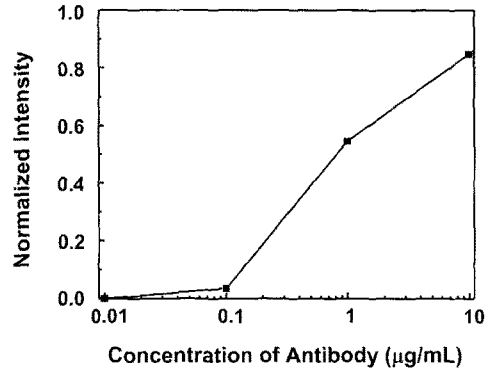


그림 6. 항체 농도에 대하여 측정된 형광의 밝기를 나타낸 그래프
 Fig. 6. Measured fluorescence intensity for various antibody concentrations.

항체의 반응이 낮게되어 발생한 현상으로 보인다.

5. 결 론

본 논문에서는 하나의 마이크로 비드를 제어하기 위한 미소유체 칩을 PDMS를 이용하여 제작하였으며, 제작된 칩을 이용하여 마이크로 비드를 이용한 QD 형광 분석 방식을 제안하여 실제 항체를 검출하는 실험을 수행하였다. 다양한 농도의 human IgG 항체를 미소유체 칩의 마이크로 챔버내에 포획된 비드의 표면에 흡착을 유도하고, 형광 측정을 위하여 QD/anti-human IgG 결합물을 다시 반응시켜주었다. 측정결과 최소 0.1 µg/mL 농도의 항체까지 측정가능함을 보였다. 제안된 미소유체 칩 및 측정방식은 향후 낮은 농도의 다양한 생체물질 (DNA, 단백질, 세포 분비물 등)들을 검출하는데 응용될 수 있을 것으로 기대한다.

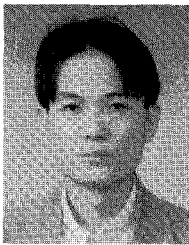
감사의 글

이 논문은 2004년도 한국과학기술원 BK21 정보기술사업단 및 산업자원부 21세기 프론티어 연구개발사업인 지능형마이크로시스템개발사업의 연구비 지원을 받아 수행되었습니다.

참고 문헌

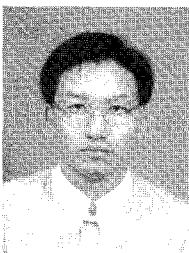
[1] S. W. Han, K. Y. Park, M. S. Kim, H. S. Kim, Y. S. Bae, and S. Y. Choi, "Fabrication and characteristics of MOSET protein sensor using nano SAMs",

- J. Kor. Sens. Soc.*, vol. 13, no. 2, pp. 90-95, 2004.
- [2] M. S. Kim, K. Y. Park, K. S. Kim, H. S. Kim, Y. S. Bae, and S. Y. Choi, "Fabrication and characteristics of MOSFET protein sensor using gold-black gate", *J. Kor. Sens. Soc.*, vol. 14, no. 3, pp. 137-143, 2005.
- [3] H.-C. Yeh, E. Simone, C. Zhang, and T.-H. Wang, "Single bio-molecule detection with quantum dots in a microchannel", *IEEE International Conference on MEMS*, pp. 371-374, 2004.
- [4] E. R. Goldman, A. R. Clapp, G. P. Anderson, H. T. Uyeda, J. M. Mauro, I. L. Medintz, and H. Mattoussi, "Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents", *Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 684-688, 2004.
- [5] K.-S. Yun, D. H. Lee, M. S. Kim, H.-S. Kim, G. M. Lee, and E. S. Yoon, "High-throughput bio-molecule detection using microbead-based assay with quantum dot fluorescence in a microfluidic chip", *Proceedings of International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (micro TAS'04)*, pp. 222-224, 2004.
- [6] X. Gao and S. Nie, "Quantum dot-encoded mesoporous beads with high brightness and uniformity: rapid readout using flow cytometry", *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 8, pp. 2406-2410, 2004.
- [7] G.-L. Lettieri, A. Dodge, G. Boer, N. F. de Rooij, and E. Verpoorte, "A novel microfluidic concept for bioanalysis using freely moving beads trapped in recirculating flows", *Lab on a Chip*, vol. 3, no. 1, pp. 34-39, 2003.
- [8] J.-W. Choi, K. W. Oh, J. H. Thomas, W. R. Heineman, H. B. Halsall, J. H. Nevin, A. J. Helmicki, H. T. Henderson, and C. H. Ahn, "An integrated microfluidic biochemical detection system for protein analysis with magnetic bead-based sampling capabilities", *Lab on a Chip*, vol. 2, no. 1, pp. 27-30, 2002.
- [9] K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, and T. Kitamori, "Determination of carcinoembryonic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassay in a microchip for cancer diagnosis", *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 6, pp. 1213-1218, 2001.
- [10] J. H. Thomas, S. K. Kim, P. J. Hesketh, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Bead-based electrochemical immunoassay for bacteriophage MS2", *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 10, pp. 2700-2707, 2004.
- [11] T. Buranda, J. Huang, V. H. Perez-Luna, B. Schreyer, L. A. Sklar, and G. P. Lopez, "Biomolecular recognition on well-characterized beads packed in microfluidic channels", *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 5, pp. 1149-1156, 2002.
- [12] M. F. Ali, R. Kirby, A. P. Goodey, M. D. Rodriguez, A. D. Ellington, D. P. Neikirk, and J. T. McDevitt, "DNA hybridization and discrimination of single-nucleotide mismatches using chip-based microbead arrays", *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 18, pp. 4732-4739, 2003.



윤 광 석

- 1996년 경북대학교 전자공학과(공학사)
- 1999년 한국과학기술원 전기 및 전자공학과(공학석사)
- 2003년 한국과학기술원 전자전산학과(공학박사)
- 현재 한국과학기술원 전자전산학과 초빙교수
- 주관심분야 : Micro analytical systems, BioMEMS



김 학 성

- 1980년 서울대학교 화학공학(공학사)
- 1982년 한국과학기술원 생물화학공학(공학석사)
- 1985년 Compiegne University, 생물화학공학(공학박사)
- 현재 한국과학기술원 생명과학과 교수
- 주관심분야 : Molecular Evolution, Biomolecular Recognition

이 도 훈

- 1999년 서울대학교 응용화학부(공학사)
- 2001년 서울대학교 응용화학부(공학석사)
- 현재 한국과학기술원 생명과학과 박사과정
- 주관심분야 : Detection of biomolecular interaction, Biosensor



윤 의 식

- 1982년 서울대학교 전자공학과(공학사)
- 1984년 서울대학교 전자공학과(공학석사)
- 1990년 University of Michigan, Department of Electrical engineering(공학박사)
- 현재 한국과학기술원 전자전산학과 부교수
- 주관심분야 : MEMS, Integrated microsystems, VLSI circuit design