

전기 검출 시스템을 이용한 Microfluidic Immuno-Sensor Chip

¹맹준호 · 이병철 · ²조철호 · 고용준 · ³안유민 · 조남규 · 이성환 · †황승용

¹한양대학교 생화학과 대학원, ²기계공학과 대학원, ³기계공학과, † 분자생명과학부

(접수 : 2006. 3. 13., 게재승인 : 2006. 9. 12.)

Microfluidic Immuno-Sensor Chip using Electrical Detection System

Joon-Ho Maeng¹, Byung-Chul Lee, Chul-Ho Cho², Yong-Jun Ko, Yoomin Ahn³, Nahm-Gyoo Cho,
Seung-Hwan Lee, and Seung Yong Hwang†

¹Department of Biochemistry, Graduate School, Hanyang University, Ansan, Gyeonggi-do 426-791, Korea

²Department of Precision Mechanical Engineering, Graduate School, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

³Department of Mechanical Engineering, Hanyang University, Ansan, Gyeonggi-do 426-791, Korea

† Division of Molecular and Life Science, Hanyang University, Ansan, Gyeonggi-do 426-791, Korea

(Received : 2006, 3. 13., Accepted : 2006. 9. 12.)

This study presents the characterization of an integrated portable microfluidic electrical detection system for fast and low volume immunoassay using polystyrene microbead, which are used as immobilization surfaces. In our chip, a filtration method using the microbead was adopted for sample immobilization and immunogold silver staining (IGSS) was used to increase the electrical signal. The chip is composed of an inexpensive and biocompatible Polydimethylsiloxane (PDMS) layer and Pyrex glass substrate. Platinum microelectrodes for electric signal detection were fabricated on the substrate and microchannel and pillar-type microfilters were formed in the PDMS layer. With a fabricated chip, we reacted antigen and antibody according to the procedures. Then, silver enhancer was injected to increase the size of nanogold particles tagged with the second antibody. As a result, microbeads were connected to each other and formed an electrical bridge between microelectrodes. Resistance measured through the electrodes showed a difference of two orders of magnitude between specific and nonspecific immuno-reactions. The detection limit was 10 ng/ml. The developed immunoassay chip reduced the total analysis time from 3 hours to 50 min. Fast and low-volume biochemical analysis has been successfully achieved with the developed microfilter and immuno-sensor chip, which is integrated to the microfluidic system.

Key Words : Immunoassay, IGSS, nanogold, PDMS, microfilter

서 론

최근 bio-MEMS (Micro electric mechanical system), μ -TAS (Total analysis system), microfluidics 등의 IT기술과 생화학적으로 유용한 나노바이오 물질을 다루는 BT기술의 접목이 이루어지면서 microbiochip에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 현장에서 실시간으로 간편하게 진단할 수 있는 진단용 장치의 필요성이 대두되면서 microbiochip 분야에서 좀 더 세분화된 biosensor가 각광을 받고 있다(1). Biosensor는 각종 생리활성 물질 및 화학물질을 빠르고 실

시간으로 분석, 측정, 진단할 수 있는 휴대용 검출 장비로써 측정대상에 따라 DNA, enzyme, antibody, toxicant, cell chip 등으로 세분화할 수 있다(2). 특히 항원-항체의 강력한 특이적 결합력을 이용한 Immunosensor는 민감도나 특이성 부분에서 다른 분석방법들보다 우수한 특성을 보인다(3). 현재 microbiochip으로 immunosensor를 구현하기 위해 형광(4), 흡광(5), 질량(6), 전기화학(7) 등 다양한 신호 검출 방법을 시도하고 있다. 하지만 이러한 검출방법은 고가의 장비가 필요하고 다루기도 쉽지 않다. 또한 장비 자체의 부피가 커서 현장에서 시료반응은 가능하나 반응신호를 검출할 수 없기 때문에 microbiochip에 적용하기에는 한계가 있다. 우리는 기존의 검출방법들이 POC (Point of care)를 구현할 수 없다는 단점을 극복하기 위해 여러 가지 전기 신호 변환 방법 중 gold와 silver nano-particle을 사용하여 전기 신호를 검출하는 방법을 선택하였다.

† Corresponding Author : Division of Molecular and Life Science, Hanyang University, Ansan, Gyeonggi-do 426-791, Korea
Tel : +82-31-400-5516, Fax : +82-31-400-5518
E-mail : syhwang@hanyang.ac.kr

두 전극사이 microbead를 고정시키고 비드표면에 indirect ELISA 방법에 의해 특이적으로 항원-항체를 반응시킨다. 검출항체에는 10 nm gold nanoparticle이 결합되어 있다. 여기에 silver enhancer를 처리하면 gold nanoparticle의 직경이 증가하게 된다(8, 9). 결국 bead와 bead끼리 서로 연결이 되어 두 전극사이에 전기가 흐르는 bridge 역할을 하게 된다 (Fig 1). 신호증폭을 위해 silver enhancer를 사용하는 방법은 현재 immunocytochemistry에 널리 쓰이고 있는 방법으로 IGSS (Immunogold silver staining)라고 하며 높은 민감도와 특이성을 가진 면역분석기술이다. IGSS를 이용한 연구는 이미 DNA와 protein을 사용하여 array와 bead 방식으로 연구가 되었으며 그 효율성도 검증이 되었다(10-12).

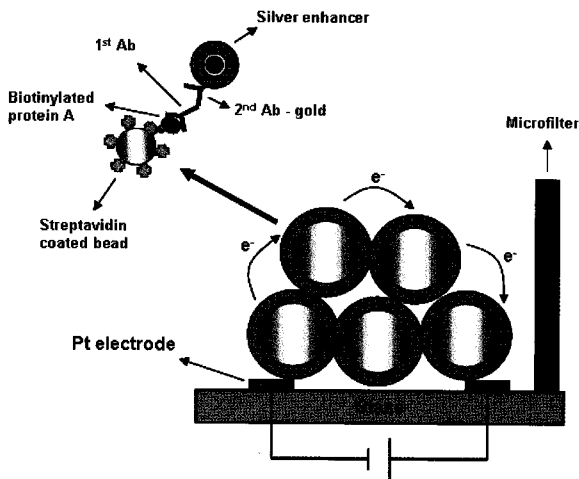


Figure 1. Analytical concept of the electrical immunoassay with microbead which coupled the IGSS.

본 연구에서는 glass와 PDMS로 제작된 microbiochip을 통하여 immunoassay를 수행하고, immunoassay의 결과를 전기적으로 검출할 수 있는 시스템을 개발하고자 다음과 같은 세부 연구를 수행하였다. 첫째, bead를 고정시키기 위해 가장 단순하면서 효율적인 디자인을 고려하였다. 둘째, microbiochip 내에서 항원-항체 반응이 최적화된 조건에서 수행될 수 있도록 여러 가지 인자 (pH, 온도, flow rate 등)를 고려하였다. 셋째, 다양한 농도의 시료로 chip 상에서 immunoassay를 수행하여 dynamic range를 설정하였으며, 이 결과를 바탕으로 chip의 민감도와 특이성을 평가하였다.

재료 및 방법

재료

Microbead는 UltraLink Immobilized Streptavidin (Pierce, USA)을 사용하였고 직경은 50~80 μm 이다. Microbead에 고정시킬 항원으로는 Protein A (Sigma, USA)를 사용하였다. Protein A의 biotinylation은 Sulfo-NHS-Biotin Reagents (Pierce, U.S.A)를 사용하였다. Protein A와 결합할 일차항체는 anti-protein A (produced from rabbit)를 사용하였다. Anti-protein A와 결합할 이차항체는 형광 관찰시에는 FITC

conjugated anti-rabbit IgG (produced from goat, Sigma, USA), 전기 신호 검출시에는 10 nm gold conjugated anti-rabbit IgG (produced from goat, Sigma, USA)를 사용하였다. Gold particle의 직경을 증가시키기 위해 Silver enhancement Kit (Sigma, USA)를 사용하였다. Washing buffer는 0.1 M BupH Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.2, Pierce, USA)을 사용하였다. 시료를 일정한 속도로 주입하기 위해서 syringe pump (KD Scientific, USA)를 사용하였다. 형광 관찰시에 CLSM (Confocal laser scanning microscope, Leica, Germany)으로 관찰하였고 전기 신호 측정시에 multimeter (Fluke, USA)를 사용하였다. 모든 실험은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 수행하였다.

Microbiochip을 위한 mold 설계 및 제작

Glass wafer (Pyrex7740) 위에 positive photoresist인 AZ1512를 도포한 후 spin coater (CEE, USA)를 이용하여 coating하였다. 최종 AZ1512의 코팅높이는 약 1.2 μm 이다. PR (Photoresist)에 남아 있는 solvent를 제거하기 위해 hotplate에서 100°C 로 90초 동안 baking하였다. 그리고 photolithography 공정을 수행하여 chip의 형상을 patterning하였다. Patterning한 후 lift-off 공정을 수행하기 위해 patterning된 상태에서 metal sputter로 Ti/Pt 층을 각각 100 \AA /700 \AA 씩 증착하였다. Metal deposition 후에 금속 층 밑에 남아 있는 PR을 제거하기 위해 acetone을 이용하여 약 10분 정도 PR을 strip하였다. 그 후 Deionized water로 cleaning하고 spin dry로 건조시켰다. 마지막으로 dicing saw를 이용해 dicing하여 최종적인 glass chip을 완성하였다.

PDMS를 이용한 microfilter 및 channel 제작

Si wafer 위에 negative photoresist인 SU-8을 풀고루 바로 spin coater의 회전속도를 700~800 rpm 사이로 조절하여, SU-8의 코팅높이를 150 μm 사이로 조절하였다. 코팅된 SU-8은 90°C 에서 15분간 prebake시켰다. 그리고 SU-8이 코팅된 Si wafer 위에 channel이 디자인된 포토마스크를 놓고 365 nm의 자외선 (UV)으로 120~180초간 노광하였다. 노광이 완료된 Si wafer는 현상액 (SU-8 solvent)에 담귀 5분간 현상한 후 90°C 에서 15분간 postbake하였다. SU-8로 channel이 형성되어있는 Si wafer위에 액상의 PDMS를 부은 다음, 진공을 걸어 PDMS에서 기포를 모두 뽑아낸 후 70°C oven에서 2시간 정도 두어 PDMS를 고형화한 다음 고형화된 PDMS를 Si wafer에서 떼어내었다. 그 후 inlet과 outlet은 펀치를 이용한 기계적인 방법으로 형성하였다. 최종적으로 채널이 형성된 PDMS layer와 전극 패터닝이 형성된 glass substrate를 O_2 Plasma treatment를 통하여 접합하였다.

Microbead에 protein 고정

Microbead에 protein을 고정시키기 위해 ABC (Avidin-biotin coupling) 방법을 사용하였다. 먼저 -20°C 에 보관했던 Sulfo-NHS-Biotin을 상온에서 30분 동안 평형시킨 다음 1 mg/ml 농도의 protein A 1 ml에 10 mM 농도의 biotin solution 48 μl 를 첨가하여 상온 (25°C)에서 1시간동안 반응시켰다. 그 후 UltraLink Immobilized Streptavidin 50 ml와

biotinylated protein A 250 ml를 섞은 다음 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.1 M BupH Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.2, Pierce, USA)로 2번 씻어주었다. 마지막으로 100 ml BupH Phosphate Buffered Saline에 저장하였다.

Microbiochip에서 시료 및 silver enhancer 처리

Protein A가 고정된 bead를 주입하여 microfilter 앞에 고정시켰다. 그 다음 여러 가지 농도의 anti-protein A를 주입하였다. 형광 관찰시에는 10 µg/ml 농도의 FITC conjugated anti-rabbit IgG를 주입하였다. 그리고 전기 신호 검출 시에는 2.5 µg/ml 농도의 gold conjugated anti-rabbit IgG를 주입하고 silver enhancer를 주입하였다. 그 후 각각 CLSM과 multimeter로 형광과 전기 신호를 측정하였다. 시료주입 중간 단계마다 PBS buffer를 흘려보내서 반응하지 않은 것들을 제거하였다. Silver enhancement Kit은 Ag⁺이 들어있는 solution A와 hydroquinone이 들어있는 solution B로 구성되어 있다. Silver enhancer solution A와 B를 각각 200 ml씩 섞은 후 syringe pump를 이용하여 30 µl/min의 속도로 microbiochip으로 주입을 하였다. 약 7~8분 동안 상온에서 반응을 시킨 후 deionized water를 50 µl/min의 속도로 10분간 주입하여 반응하지 않은 silver enhancer를 제거하였다.

형광 및 전기 신호 검측

형광은 CLSM으로 관찰하였다. Exciting wavelength는 488 nm, emission wavelength는 530 nm으로 맞추었다. 형광과 투과 image는 각각 PMT (Photo multiplier tube) gain 1은 722, PMT trans는 86에서 관찰하였다. 형광세기는 bead가 packing되었을 때 filter에서 200 µm 떨어진 곳을 검출 지점으로 정하고 그 부분의 형광세기 값들의 평균을 취하였다. 전기 신호 검출시 저항값을 측정하였다. Multimeter에 의해 측정된 저항값은 적외선 sensor를 통해 컴퓨터로 전송이 되고 이 값들은 Fluke view form에 의해 실시간으로 저항값 변화를 그래프로 나타내었다. 저항값은 5초 간격으로 측정하였다. 이러한 수치들은 excel (Microsoft) 형식으로 추출하여 분석하였다.

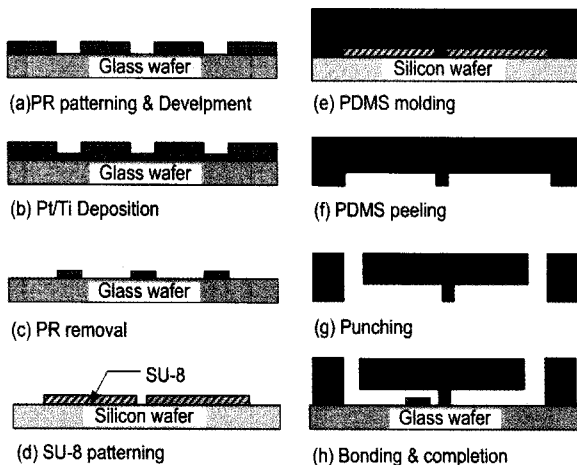


Figure 2. Fabrication process of glass and PDMS microbiochip.

결과 및 고찰

Microbiochip 제작

항원-항체가 반응할 수 있도록 liff-off 공정 순서에 따라 microbiochip을 제작하였다(Fig 2). Chip은 시료주입구 (inlet)와 배출구 (outlet), 이동로 (channel), 반응로 (reactor) 그리고 bead를 고정시키기 위한 microfilter로 구성되어 있다(Fig 3 (a)). Bead를 고정시키기 위한 microfilter는 시료 이동시에 저항을 최소화하기 위해 원기둥 모양으로 제작하였다. 또한 bead가 새는 것을 방지하기 위해 3중으로 제작하여 주입된 bead가 microfilter에 걸려서 앞쪽에 packing이 되도록 하였다. Microfilter의 직경은 150 µm이며 간격은 40 µm이다. 이러한 filter 방식은 가장 단순하면서도 효율적인 bead 고정 방식으로 쉽게 제작이 가능하다. 또한 미세 구조물들은 광학적으로 투과성을 가지는 PDMS로 제작되어 형광을 쉽게 관찰할 수 있었다. Microfilter 앞부분에 백금 (Pt) 전극이 코팅되어 있다. Bead와 전극간의 접촉면적을 최대화하기 위해 빗살모양으로 코팅하였고 전극 간격과 두께는 20 µm로 하였다(Fig 3(b), 4).

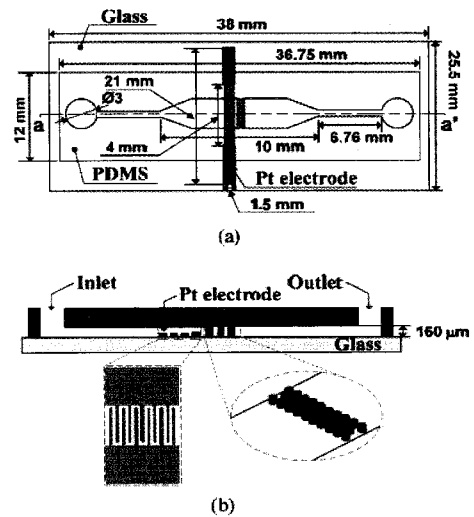


Figure 3. Schematic illustration of fabricated microbiochip ((a) top view and (b) section a-a').

반응조건 최적화

Microbiochip에서 항원-항체가 반응하기 위한 여러 가지 조건을 최적화하는 실험을 수행하였다. Microbiochip에서는 일반 tube에서와 달리 시료의 유입과 유출이 지속적으로 일어나기 때문에 반응조건을 최적화할 필요가 있다. 항원-항체의 반응조건에서 pH와 온도는 매우 중요하기 때문에 이를 확인하기 위해 실험을 하였다. 우선 protein A가 고정된 bead를 syringe pump로 주입을 하고 anti-protein A와 FITC conjugated anti-rabbit IgG를 순서대로 주입을 하고 형광을 관찰하였다. 이때 온도는 0, 10, 20, 30, 40°C에서, pH는 2, 4, 6, 8, 10에서 각각 항원-항체 반응을 시킨 후 형광세기를 관찰한 결과 10°C 이하부터 결합력이 현저히 감소하였으며 pH 5 이하와 pH 10 이상에서 형광세기가 급격히

감소하였다. 나머지 온도와 pH에서는 형광세기가 크게 차이가 나지 않았다(Fig 5). 본 실험에 사용하는 항원-항체는 비교적 넓은 범위인 pH 7~8, 20~30°C에서 최적의 반응을 나타내었다.

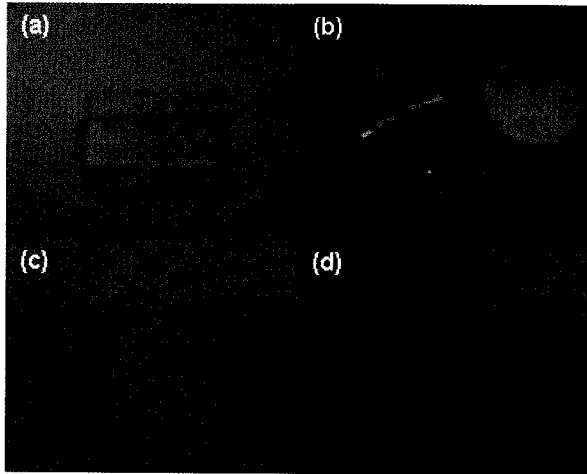


Figure 4. (a), (b) Photographs of the fabricated immuno-sensor chip; (c), (d) CLSM images of the top view of the microchannel, microfilter and Pt electrode.

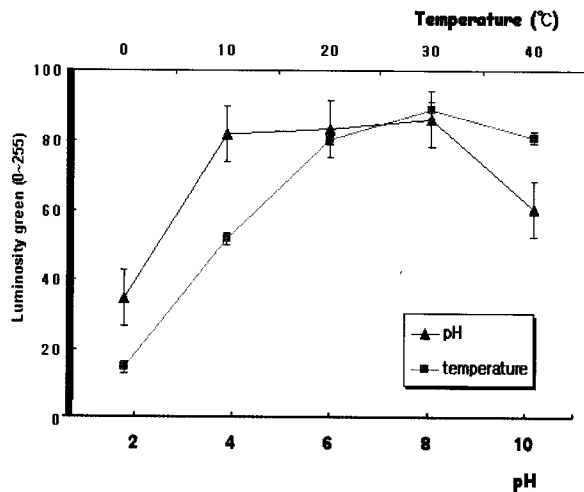


Figure 5. Temperature and pH dependence of antigen-antibody reaction. Optimal condition of antigen-antibody reaction is 20~30°C and pH 7~8.

Biosensor의 특징인 빠른 검출시간을 구현하기 위해서는 항원-항체간의 반응시간을 최대한 줄일 필요가 있다. 그래서 항원-항체를 흘려보내주는 시간인 flow time에 따라 형광세기를 측정하였다. 일차항체인 anti-protein A를 5, 7, 10, 20, 30분 동안 항원이 고정되어있는 bead에 흘려보내서 반응시켰다. 이 때 anti-protein A의 농도는 각각 10, 1, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 으로 하였다. 그 후에 FITC conjugated anti-rabbit IgG를 반응시켜 형광세기를 측정하였다. 그 결과 10분 동안 반응시켰을 때 항원-항체 반응이 포화되어 그 후에는 형광세기가 크게 증가하지 않는 것을 알 수 있었다(Fig 6). 기존의 ELISA에서 항원-항체 반응시간인 1시간을 10분으로 감소시켜 전체적인 검출시간을 크게 줄일 수 있었다. 이것

은 ELISA에서 대부분의 시간을 차지하는 반응시간을 크게 줄임으로써 현장에서 시료의 반응 및 검출을 짧은 시간에 수행할 수 있다는 것을 의미한다.

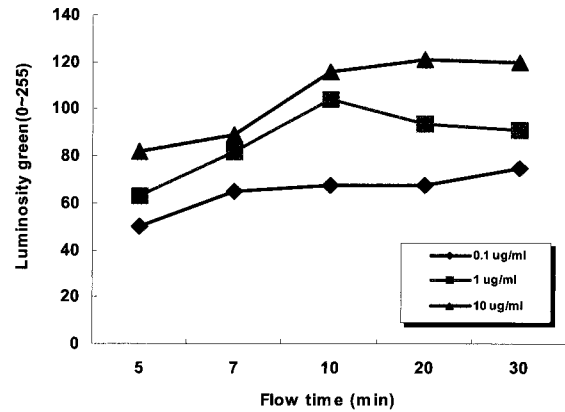


Figure 6. Fluorescence intensity as flow time. The data show that the signal intensity is saturated in 10 min.

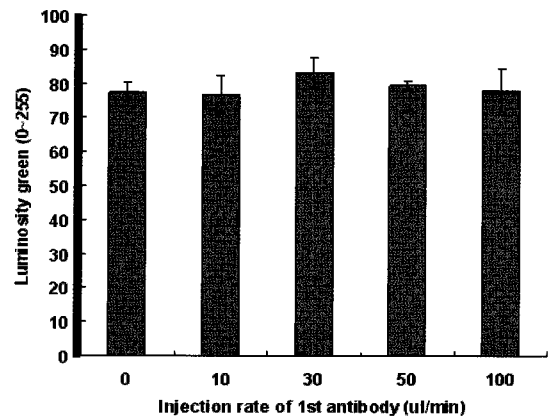


Figure 7. Confocal images (left) of microbiochip and graph of fluorescence intensity as flow rate. The data show that the flow rates of the reagent had little effect on the assay.

Flow time과 더불어서 시료를 흘려보내 줄 때의 flow rate에 따라 항원-항체 반응에 어떤 영향이 있는지 알아보았다. 실제로 flow가 없거나 매우 느릴 경우 hydrophobic group이나 negative charge를 가진 생체분자들은 PDMS나 glass에 흡착 (Adsorption)이 되는 경우가 있다. 이러한 경우 정확한 검출을 할 수 없으므로 sensor로서의 기능을 할 수 없게 된다. 따라서 0, 10, 30, 50, 100 $\mu\text{l/min}$ 의 속도로 이차항체를 10분 동안 흘려보내고 각각 형광세기를 측정하였다. 그 결과 형광세기는 거의 차이가 없었다(Fig 7). 하지만 0, 10 $\mu\text{l/min}$ 일 경우 유체의 흐름이 거의 없기 때문에 bead위에 glass 표면에 흡착되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 100 $\mu\text{l/min}$ 일 경우 flow의 압력에 의해 filter 사이로 bead가 통과하는 것을 알 수 있었다. 따라서 buffer의 flow rate는 50 $\mu\text{l/min}$, 그 외에 시료들의 flow rate는 30 $\mu\text{l/min}$ 으로 결정하였다.

위의 실험한 조건 (pH 7.2, 25°C, flow time: 10 min, flow rate: 30 μm/min)을 바탕으로 anti-protein A의 농도에 따라서 형광세기의 표준곡선을 작성하였다. 그 결과 일차항체의 농도가 증가함에 따라 형광세기도 증가하였다(Fig 8).

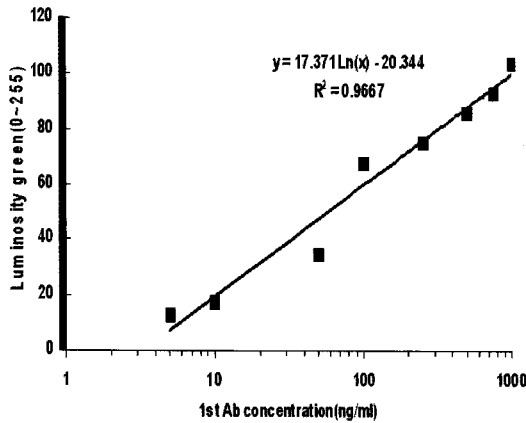


Figure 8. Calibration curve of the fluorescence intensity for different anti-protein A concentration in microbiochip. A fluorescence in microbiochip was plotted against the concentration of anti-protein A.

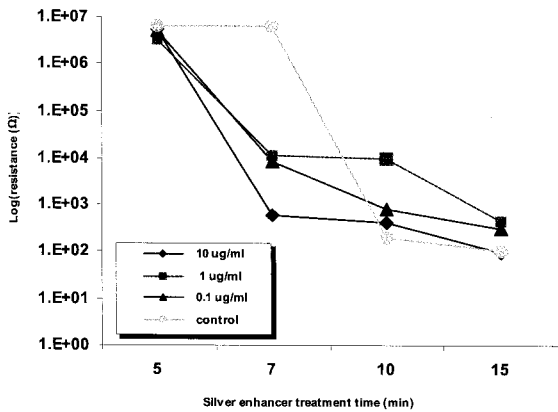


Figure 9. Representative results of electrical immunoassay for different silver enhancer treatment times.

Silver enhancer 처리시간 결정

백금 전극이 코팅된 microbiochip에서 전기 신호를 검출하기 전에 우선 silver enhancer의 처리시간을 결정하는 실험을 수행하였다. Silver enhancer는 시간이 지남에 따라 gold 입자 주위에 silver 입자들이 응집되는 반응인데 일정 시간이 지나면 silver 입자끼리 응집이 되는 self-nucleation이 일어나게 된다. 실제로 실험실에서 IGSS를 사용할 때 일정시간을 초과하여 반응을 시키면 원하지 않은 신호를 얻을 수 있기 때문에 silver enhancer 처리시간을 정하는 것은 매우 중요하다. 따라서 우리는 silver enhancer 처리시간을 결정하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 우선 일차항체까지 처리하는 순서와 조건은 형광을 관찰할 때와 동일하게 하였으며, 이 때 일차항체의 농도는 10, 1, 0.1 μg/ml로 각각 주입하였다. 그리고 control로써 일차항체를 주입하지 않았다. 이차항체를 FITC conjugated anti-rabbit

IgG 대신 gold (10 nm) conjugated anti-rabbit IgG를 사용하였다. 그 후 silver enhancer를 5, 7, 10, 15분씩 반응을 시키고, buffer로 여분의 silver enhancer를 제거한 다음 multimeter로 저항값을 측정하였다. 그 결과 7분 이상 반응을 시키면 control의 경우에도 저항값이 낮아지는 것을 알 수 있었다(Fig 9). 이것은 앞에서 말한바와 같이 self-nucleation 때문이며, 이 실험을 통하여 silver enhancer 처리시간은 7분으로 정하였다.

Table 1. Sequence of immunoassay using the electrical signal detection

Sequence	Condition	Reaction time
Bead filling (Conjugated protein A)	φ 60 μm polystyrene bead, 6ul	20 sec
1 st Ab Injection	100 ~ 0.1 μg/ml, 6ul	10 min
Washing buffer	0.1 M PBS (pH 7.2)	30 sec
2 nd Ab Injection	10 μg/ml; 10 nm gold-labeling antibody, 10ul	10 min
Washing buffer	D.I. water (pH 7.2)	30 sec
Silver enhancer Injection	500 ul (Ag ⁺ + reducing solution)	8 min
Washing buffer	D.I. water (pH 7.2)	10 min
Signal detection	Fluke 189, Fluke view form	2 min

Total time : <60 min

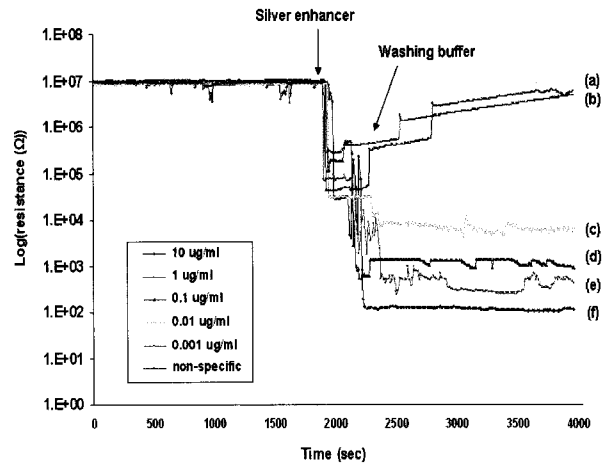


Figure 10. The electrical resistance was measured across the platinum electrode using Fluke 189 multimeter. (a) non-specific binding; (b) 0.001 μg/ml; (c) 0.01 μg/ml; (d) 0.1 μg/ml; (e) 1 μg/ml; (f) 10 μg/ml. Silver enhancer was treated from 30 to 37 min and then washed with deionized water for 10 min. Resistance electric signal between (a), (b) and (c) was 1000 fold difference.

전기 신호 검출

Silver enhancer 처리 후 마지막으로 deionized water로 10분 동안 washing을 한 다음 전기 신호를 측정하였다. 전기 신호를 측정하는 지점은 마지막 washing buffer를 흘려보내는 10분 동안이며, 이 때 측정된 저항값의 평균을 시료의 최종 저항값으로 정하였다. 10분 동안 buffer를 흘려보내는 이유는 silver enhancer를 처리하고 washing buffer를 흘려보내는 2~3분 동안 불안정한 값을 나타내는 경우가 많았기 때문이다. 이것은 제작된 칩의 inlet이 하나이기 때문에 시료 교체시에 inlet과 outlet의 압력차에 의해 flow의 흐름이 역행하게 되고, 이 때 bead의 위치가 조금씩 바뀌기 때문이다. 하지만 5~10분 정도 지난 후에는 bead의 위치가 고

정되면서 비교적 안정적인 전기 신호를 얻을 수 있었다. 마지막 buffer 처리까지 실험 조건을 최적화한 다음 bead 주입부터 최종 분석까지 실험순서를 정리하였다(Table 1).

이렇게 최적화된 실험 순서에 따라 anti-protein A의 농도 별로 저항값을 각각 측정하였다. 그 결과 anti-protein A의 농도가 증가할수록 저항값은 감소하였다(Fig 10). 이것은 농도가 클수록 bead와 백금전극간의 연결 가능성이 크게 증가하기 때문이다. 또한 전기 검출 시스템의 검출한계는 10 ng/ml이었다. 추가적으로 우리는 anti-protein A의 농도에 따른 저항값을 각각 10회 반복하여 측정하였다. 그 결과 농도에 따라 일정범위의 저항값을 나타내는 것을 알 수 있었다(Fig 11). 실제로 표준곡선을 통한 농도측정은 현재 immunoassay뿐만 아니라 여러 가지 생체분자를 정량할 때 많이 사용되는 것으로, 전기 신호 검출법으로도 정량측정이 가능하다고 판단된다.

현재 biosensor의 실용화를 위해 다양한 검출 시스템이 연구되고 있는 가운데, bead를 기반으로 한 전기 검출법은 bead에 생체분자를 고정화하기 쉽고, 어떤 생체분자를 고정시키느냐에 따라 여러 가지 질병을 검출할 수 있기 때문에 다양한 분야에 응용할 수 있다. 또한 전기 신호 고유의 민감성을 이용하여 아주 적은 양의 시료도 검출할 수 있다. 마지막으로, 짧은 시간에 적은 시료로 본 실험을 수행할 수 있었기 때문에 실제로 biosensor 적용이 가능하다고 판단된다.

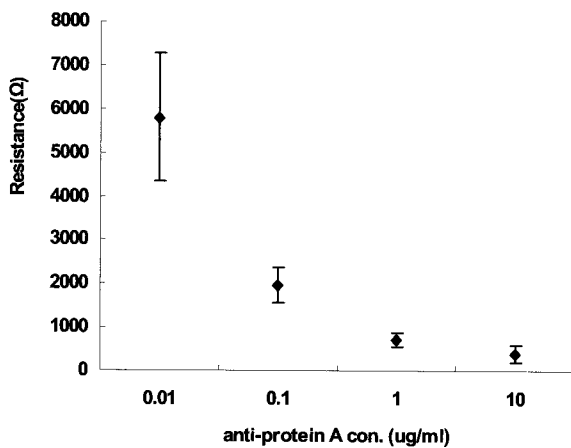


Figure 11. Calibration curve of electrical signal for different anti-protein concentrations. Each concentration point had a characteristic range of resistance.

요 약

Bio-MEMS를 기반으로 microfilter와 백금 전극이 내재되어 있는 microbiochip을 제작하였다. 우리는 이 chip으로 microbead에 indirect ELISA 방법으로 항원-항체를 반응시키고 전기 신호 검출 방법을 이용하여 반응 여부를 판단하였다. 이 때 신호 증폭을 위해 silver enhancer를 사용하였다. Chip 상에서 항원-항체 반응 조건을 최적화하기 위해 pH, temperature, flow time, flow rate, silver enhancer time을

결정하였다. 이렇게 최적화된 조건을 바탕으로 짧은 시간 안에 소량의 시료로 immunoassay를 성공적으로 수행할 수 있었다. 전기 신호 검출 방식을 사용함으로써 biosensor 장비의 소형화와 다중 시료 측정과 자동화를 biosensor에서 적용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (과제번호: R01-2003-000-10614-0) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kissinger, P. T. (2005), Biosensors a perspective, *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 2512-2516.
- Khandurina, J. and A. Guttmann (2002), Bioanalysis in microfluidic devices, *Chromatography* **943**, 159-183.
- Luppa, P. B., L. J. Sokoll, and D. W. Chan (2001), Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta* **314**, 1-26.
- Hayes, M. A., N. A. Polson, A. N. Phayre, et al. (2001), Flow-based Microimmunoassay, *Analytical Chemistry* **73**, 5896-5902.
- Seydack, M. (2005), Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods, *Biosensors and bioelectronics*, **20**, 2454-2469.
- Figeys, D. (2002), Adapting arrays and lab-on-a-chip technology for proteomics, *Proteomics* **2**, 373-382.
- Rossier, J. S. and H. H. Girault (2001), Enzyme Linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection, *Lab on a chip* **1**, 153-157.
- Rosenzweig, Z. (2002), Development of an Aggregation-Based immunoassay for Anti-Protein A using Gold Nanoparticles, *Analytical Chemistry* **74**, 1624-1628.
- Hacker, G. W. and W. H. Muss (1996), Electron Microscopical Autometallography: Immunogold-Silver Staining (IGSS) and Heavy-Metal Histochemistry, *Enzymology* **10**, 257-269.
- Velev, O. D. and E. W. Kaler (1999), In Situ Assembly of Colloidal Particles into Miniaturized Biosensors, *Langmuir* **15**, 11-17.
- Xue, M., J. Li, and Z. Lu, et al. (2002), Array-Based Electrical Detector of Integrated DNA Identification System for Genetic Chip Applications, *ESSDERC*, 483-486.
- Hagelsieb, L. M., P. E. Lobert, and R. Pampin, et al. (2004), Sensitive DNA electrical detection based on interdigitated Al/Al₂O₃ microelectrodes, *Sensors and Actuators B* **98**, 269-274.