

분리용 Lab-on-a-Chip Microfluidic Separation Lab-on-a-Chip

노경원, 김영찬, 임관섭, 박노경, 심봉주, 한종훈
포항공과대학교 화학과

Kyung Won Ro, Young Chan Kim, Kwanseop Lim, Nokyoung Park,
Bong Chu Shim and Jong Hoon Hahn
Department of Chemistry,
Pohang University of Science and Technology

Abstract - Microfluidic devices are finding increasing application as analytical systems, biological devices, and tools for chemistry and biochemistry. Research into miniaturation is primarily driven by the need to reduce costs by reducing the consumption of expensive reagents and by increasing throughput and automation. This paper describes three microfabricated devices for separation after precolumn reaction, absorbance detection using optical fiber and sample clean-up using multiphase microfluidics. Fabrication of microfluidic devices in polydimethylsiloxane (PDMS) by replica molding and glass by etching methods is described.

Key words - Lab-on-a-chip, Precolumn reaction, Absorbance detection, Desalting

1. 서 론

지난 10년간 분석기술의 소형화는 분석분야의 주된 연구분야로 자리잡아왔다. [1] 많은 시료와 시약을 작은 단위로 처리하며 동시에 분석이 가능한 초소형 장치의 개발은 많은 과학자들의 관심을 일으켰으며 이를 연구하는 과학자의 수 또한 증가하고 있다. 몇몇 과학자들은 마이크로칩이 컴퓨터와 전자공학 분야에 일대 혁명을 가져온 것처럼 이러한 초소형 장치가 분석과 합성에도 커다란 변화를 가져올 것으로 기대하고 있다. [2] 이러한 예상이 가능한 이유는 초소형 장치의 사용으로 값비싼 시료의 소모량을 줄임으로써 분석에 드는 비용을 줄일 수 있을 뿐 아니라 분석에 의해 발생하는 환경 유해 물질의 배출을 크게 감소시킬 수 있기 때문이다. 동시에 분석장치의 자동화가 용이하며 분석시간을 크게 단축시킬 수 있는 장점을 가지고 있기 때문이기도 하다. Lab-on-a-chip은 분석에 필요한 모든 과정을 하나의 작은 칩 위에서 수행될 수 있도록 여러 개의 채널이나 미세 구조물들을 포함하는데 이를 제작하기 위하여 반도체 제작 공정에 사용되는

미세가공기술이 이용된다. [3]

본 연구에서는 다양한 개념의 칩을 개발하였다. 우선 일반적으로 사용되는 레이저 유발 형광법에 필요한 유도체화 반응과 분리를 단일 칩에서 구현할 수 있는 방법을 개발하였다. 단일 유리판 위에 제작된 칩을 이용하여 biogenic amine류를 분리 검출하였다. 또한 광섬유를 이용한 광 투과거리가 긴 흡광검출칩을 개발하였다. 이 칩은 몰딩 기법을 이용하여 제작하여 복잡한 구조를 반복적으로 쉽고 신속하게 제작할 수 있다. 전기삼투흐름을 이용한 일반적인 유체흐름 방법 이외에도 펌프를 이용한 유체역학적 흐름을 이용한 칩도 제작하였다. 칩 내부에 형성된 유선형 유체흐름을 이용하여 단백질 분석에 쓰이는 질량분석기를 위한 전처리용 칩을 개발하였다.

2. Precolumn 반응 및 분리칩

2.1 Biogenic amine 분리

Lab-on-a-chip에서는 전기삼투흐름(Electroosmotic flow; EOF)을 이용하여 수백 pL 정도로 극소량의 생체물질들을 분리, 분석하

게 된다. 이렇게 적은 양의 시료를 검출하기 위해서는 고감도의 검출방법들이 요구되고 그 중 감도가 가장 좋은 검출방법이 레이저 유발형광(laser induced fluorescence; LIF) 검출법이다. 형광검출방법을 이용하기 위해서는 물질자체에 형광을 유발하는 기능이 있어야 하지만 대부분의 물질에는 이러한 형광 유발 기능이 없기 때문에 유도체화 반응을 통해 분석하고자 하는 물질에 형광물질을 결합시켜 분석하게 된다.

유도체화 방법으로 많이 사용되는 방법중의 하나인 precolumn 반응법은 분석물질과 형광물질을 미리 반응시켜 유도체화를 수행한 후 분리하는 방법이다. 이 방법은 자동화가 쉽다는 장점이 있으나 기존의 분석장치에 시료 이송장치 및 반응장치가 덧 붙여져야 하고 반응조건 및 분석조건을 정밀하게 조절할 수 있어야 한다.

그러나 lab-on-a-chip에서는 반응장치와 분리 장치를 하나의 칩 내에 통합시켜 제작할 수 있고 반응 및 분리 조건을 쉽게 조절할 수 있다는 장점이 있다. Jacobson 등은 glass를 사용하여 반응장치 및 분리채널이 통합된 lab-on-a-chip을 제작한 후 아미노산의 precolumn 반응, 분리 및 검출을 수행하였다. [4]

Biogenic amine류는 아미노산이 생체내에서 분해되어 생성되는 물질로서 histamine, tyramine, phenethylamine, putrescine, spermidine 등이 대표적인 물질들이다. 이들은 단백질이 많은 식품(어류, 육류), 주류(포도주, 맥주) 등에 특히 많이 존재하며 보관 기간이 오래될수록 그 양이 증가하는 것으로 알려져 있다. 이 물질들을 다량 섭취할 경우 두통, 구토, 현기증, 고혈압 등을 유발할 수 있는 독성 물질들이다. 이러한 이유로 이 물질들에 대한 독성 및 식품의 신선도를 평가할 수 있는 지표물질로 많은 연구가 수행되고 있다. Rodriguez 등은 biogenic amine류에 형광유도체화 시약인 fluorescein isothiocyanate(FITC)를 반응시킨 후 lab-on-a-chip에서 분리, 분석을 수행하였다. [5] 그러나 Rodriguez 등의 연구에서는 amine류와 FITC를 12시간 정도 암실에서 반응시킨 후 분리하므로써 반응속도가 느리고 분석시간도 오래 걸리는 단점이 있다.

본 연구에서는 biogenic amine류를 칩 내에서 o-phthalaldehyde(OPA)와 biogenic amine

류를 2 nL의 부피를 갖는 precolumn 반응장치에서 반응시키고 38.5 mm 길이의 분리 채널에서 분리 및 검출을 수행할 수 있는 lab-on-a-chip을 제작하여 biogenic amine들의 precolumn 반응, 분리 및 검출을 2분 이내에 수행할 수 있었다.

2.2 시약 및 기기장치

2.2.1 시약

본 연구에 사용된 4종의 Biogenic amine들(histamine (His) dihydrochloride, tyramine (Tyr), putrescine (Put), tryptamine (Trp)은 모두 Tokyo Kasei사(Tokyo, Japan)로부터 구입하였으며 각각을 1.0 mg/ml 농도로 증류수에 녹인 후, 실험 전에 완충용액으로 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. Dansyl-chloride (DNS-Cl), o-phthalaldehyde(OPA), N-acetylcysteine (NAC), sodium borate (Borax) decahydrate, sodium dodecyl sulfate (SDS), fluorescein isothiocyanate(FITC) 및 fluorescein은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 완충용액은 25mM의 sodium borate 용액에 5%의 메탄올, NAC 및 SDS를 적당한 농도로 첨가한 후 1 M NaOH 용액으로 pH를 조절하여 사용하였다.

2.2.2 기기 장치

Lab-on-a-chip에서의 용액 흐름 조절을 위해 고전압 공급장치(MP5, Spellman High Voltage Electronic)와 고전압용 릴레이(K45C332, Kilovac)를 사용하였고 기기의 조절은 LabView 4.0 프로그램과 Lab-PC-1200 multifunction I/O board (National Instruments)를 사용하여 컴퓨터로 컨트롤 하였다. 채널에서의 용액 흐름 및 시료의 주입, 분리 모습은 아르곤 이온 레이저(488 nm, Lixel 95, Lixel laser)와 CCD camera(Monochrome High-Res, Edmund Industrial Optics)로 관찰하였다.

분리된 OPA-biogenic amine들의 검출을 위해 He-Cd 레이저(325nm, Omnicrome 3056-M-A01)의 빛을 볼록렌즈(CVI laser)로 집광하였다. 시료로부터 방출된 형광은 대물렌즈(10×, N.A. 0.30, Nikon)로 모아 공간 필터(직경 0.5mm의 pinhole)와 광학필터(450nm bandpass, 10nm bandwidth)를 통과시킨 후 광전증배관(HCI20-01, Hamamatsu)으로 검출하

었다. 데이터는 Autochro-Win 데이터 시스템 (v.2.0, 영린기기)으로 수집, 처리하였다.

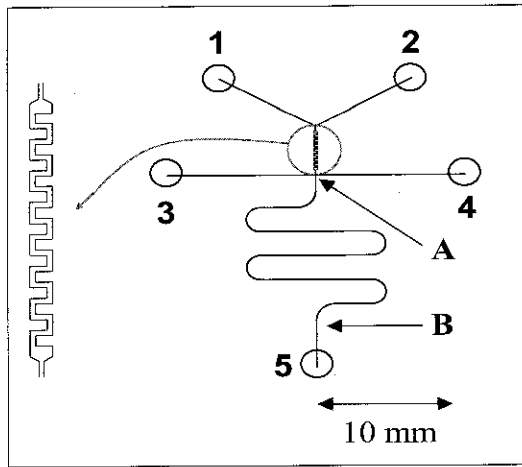


그림 1. Precolumn 반응 및 분리용 칩.

A: 시료 주입부, B: 시료 검출부. 저장 용기 1: 시료 용액, 2: 반응 용액, 3: 배출된 시료 용액, 4: 완충용액, 5: 배출된 완충용액. 채널 폭 $50 \mu\text{m}$, 깊이 $16 \mu\text{m}$, 분리 채널 길이 38.5mm .

2.3 칩 제작 방법

Glass chip은 그림 1의 패턴이 새겨진 포토마스크를 사용하여 일반적인 photolithography와 chemical etching 방법을 사용하여 제작하였다. 먼저 포지티브 포토레지스트 (DTFR-1000, 동진화성)를 유리판 위에 스펀코팅 한 후 포토마스크를 위에 놓고 UV로 노광, 현상하였다. 유리판을 희석한 HF/NH₄F 용액에 담가 $10 \mu\text{m}$ 깊이로 에칭하여 채널을 새긴 후, 포토레지스트를 제거하고 세척하였다. 다른 유리판에 용액 저장 용기를 붙일 구멍을 뚫은 후 채널이 새겨진 유리판 위에 덮고 6시간 정도 가열하여 접합하였다. 마지막으로 마이크로 시린지 팁을 잘라 유리판 위에 접착시켜 glass chip을 제작하였다. (그림 2)

2.4 Precolumn 반응 및 분리, 검출

2.4.1 Chip에서의 주입 및 분리 모습

Chip에서 시료의 주입 및 분리 모습을 관찰하기 위해 모든 채널과 시료 용기에 완충용액을 채우고 그림 1의 시료 용기 1에 각 $20 \mu\text{M}$ 의 FITC와 fluorescein을 넣었다. 시료 주입 전에는 용기 1, 2에 1.05 kV , 용기 3에 1.5 kV 및 용기 4에 0.45 kV 의 전압을 가하고 용기 5는 접지를 하였다. 이때의 전

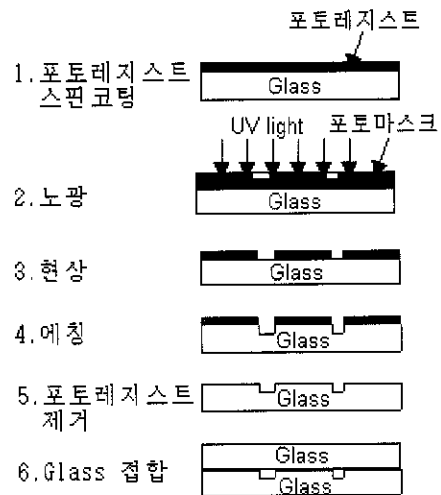


그림 2. Glass lab-on-a-chip 제작 공정.

압 배치에서 반응장치에서의 전압 강하는 100 V/cm 이며 분리 채널에 걸리는 전압은 239 V/cm 이다. 이 전압 구성에서 용기 1, 2의 시료 및 반응물질은 1:1의 부피 비로 반응장치로 전기삼투흐름으로 흘러 들어간 후 반응된 물질들은 용기 4로 이동한다. 이때 용기 3의 완충용액은 전기 삼투 흐름에 의해 용기 4 및 용기 5로 이동하게 되며 이 완충용액의 흐름은 반응 생성물이 분리 채널로 이동하지 못하도록 막아준다. 시료 주입시에는 용기 3의 전압을 짧은 시간($0.1 \sim 2.0$ 초) 동안 끊어주면 시료가 분리 채널로 이동하게 된다. 시료 주입을 멈추기 위해 용기 3에 다시 전압을 다시 가하면 일정량의 시료가 분리 채널로 이동하면서 분리가 일어난다.

그림 3에 precolumn 반응 및 분리 chip에서 FITC와 fluorescein 혼합물이 주입되어 분리되는 모습을 CCD camera로 관찰한 결과를 보였다.

2.4.2 Precolumn 반응 및 분리

Biogenic amine의 OPA와의 precolumn 반응을 chip 내에서 수행하기 위해 모든 채널과 시료 용기에 완충용액을 채우고 그림 1의 시료 용기 1에 각 4종의 biogenic amine과 DNS-OH 혼합용액을 넣었다. 용기 2에는 OPA와 NAC 각 10 mM 혼합용액을 넣은 후 위에서 동일한 전압구성으로 전압을 가해 시료의 반응, 주입, 분리 및 검출을 수행하였다. 시료의 검출은 그림 1의 B(시료 검출부) 부분에 He-Cd 레이저 빔을 집광하여 조사

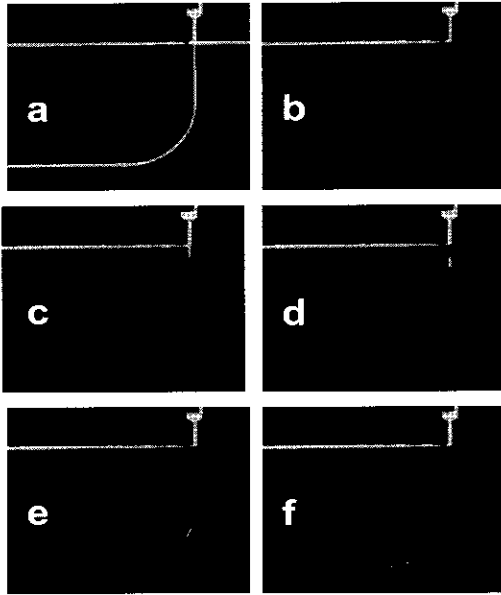


그림 3. Chip에서의 시료 주입 및 분리 모습.
a: 모든 채널에 형광물질을 채운 상태, b: 시료 주입 전, c: 주입 순간, d: 주입 직후, e: 채널 내 이동, f: 시료의 분리.

하고 방출된 형광은 대물렌즈로 모아 광증배관으로 검출하였다.

2.5 결과 및 토의

2.5.1 분리 조건 설정

OPA로 유도체화된 4종의 biogenic amine 및 내부표준물(DNS-OH)의 최적 분리를 위해 SDS 농도 및 완충용액의 pH를 변화시켜 분리도를 측정하였다.

SDS 농도에 따른 분리도의 영향을 보기 위해 완충용액에 SDS를 각각 0, 10, 25, 50, 100 mM의 농도로 첨가하였다. SDS를 첨가하지 않았을 때는 his를 제외한 모든 물질들이 분리가 되지 않았다. SDS를 10mM 농도로 첨가했을 때 4종의 아민들이 분리되었으나 tyramine 과 내부 표준물이 겹쳐서 나타났고 SDS 25mM 일 때 최적 분리를 보였다. 이후 SDS 농도를 계속 증가시키면 분리시간이 점점 길어지고 띠 넓힘 현상이 심해졌다. pH 변화에 따른 분리도 변화를 실험한 결과 pH 9.5에서는 tyr과 put가 분리되지 않았으며 pH를 증가시키자 분리도가 향상되었으나 띠 넓힘 현상이 나타났다. 최적 분리를 위한 pH는 10.0 이었다. 분리조건 설정 실험 결과 OPA-biogenic amine들의 최적분리는 pH 10.0의 25mM sodium borate

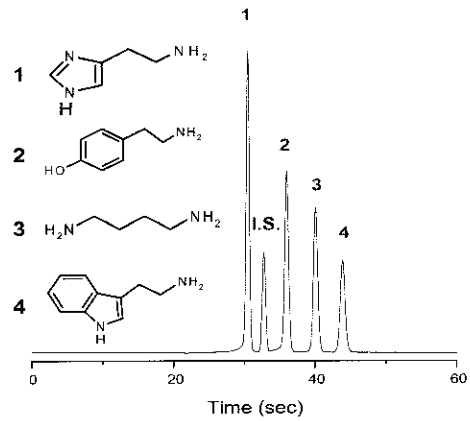


그림 4. Chip에서의 OPA-biogenic amine과 내부표준물의 electropherogram. 1: His, 2: Tyr, 3: Put, 4: Trp, I.S.: DNS-OH.

용액에 10mM의 NAC 및 25mM의 SDS와 5% MeOH을 첨가한 완충용액에서 1분 내에 수행할 수 있었다. 그림 4는 최적화된 분리 조건에서 4종의 OPA-biogenic amine과 내부 표준물을 분리한 모습이다.

2.5.2 분리 효율 및 검출 한계

최적 분리조건에서 biogenic amine들의 분리 효율을 이론단수로 측정하였다. 각 아민들의 이론단수는 10,300~5,500 정도로 좋은 분리 효율을 보였다. OPA-biogenic amine들의 검출한계는 0.1~0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준 (S/N=3)이며 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도범위에서 상관계수 0.998~0.999의 좋은 직선성을 보였다. OPA-biogenic amine의 분리 효율 및 검출한계를 표 1에 정리하였다.

표 2. 분리 효율 및 검출한계.

	이동시간 (초)	이론단수	HETP (μm)	검출한계 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
His	30.9	10,300	3.5	0.1
Tyr	36.9	7,400	4.8	0.2
Put	41.3	6,700	5.3	0.4
Trp	46.2	5,500	6.5	0.4

2.6 결 론

본 연구에서는 기존의 분석 장치에서 고가의 장비가 필요하고 조건 설정이 어려운 precolumn 반응 및 분리를 lab-on-a-chip을 사용하여 간편하고 매우 높은 효율로 수행한 결과를 보였다. Precolumn 반응장치와 분리

채널이 통합된 lab-on-a-chip은 광식각 및 에칭방법을 이용하여 glass 재질로 제작하였다. 이 chip에서 biogenic amine들을 OPA와 precolumn 반응 시켜 1분 이내에 분리 및 검출을 수행할 수 있었다. 최적 분리 조건에서 4종의 amine들과 내부 표준물을 높은 분리 효율로 분리할 수 있었으며 ppm 이하의 고감도 분석이 가능하였다. 앞으로 분리 채널 모양의 재 설계, 채널 깊이의 증대 등을 통해 분리 효율 및 분석 감도를 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 부가장치의 소형화 및 실제 시료 분석에 필요한 전처리 장치의 통합 등이 이루어진다면 lab-on-a-chip은 휴대용 분석 시스템으로의 가능성이 무한할 것으로 기대된다.

3. 흡광 검출용 lab-on-a-chip

3.1 흡광검출

모세관 전기이동법에서의 검출 방법중 흡광검출방법은 검출감도가 형광검출법보다 낮다는 단점이 있지만 검출 가능한 시료의 종류가 많고 유도체화 등의 부가 반응이 필요 없다는 장점이 있어 가장 널리 사용되고 있는 검출 방법이다. 그러나 마이크로 chip에서는 채널의 깊이가 얇아 광 투과 거리가 짧기 때문에 흡광검출 감도가 낮다는 문제가 있다. 이 문제를 해결하기 위해 Liang 등은 마이크로 chip 내부에 U 자형 검출 셀을 제작하여 광 투과 거리를 증가 시켰다. [6] Liang 등이 개발한 U-cell 검출장치는 광섬유를 이용하여 빛을 채널에 입사시키고 투과된 빛은 다시 광섬유로 받게된다. 그러나 광섬유를 이용한 U-cell 흡광검출장치는 glass를 이용하여 제작하였기 때문에 광섬유를 채널의 중심에 정확히 일치시켜 삽입하기가 힘들고, 칩 제작에도 시간이 많이 소요되는 단점이 있다. 또한 에칭된 채널의 단면이 사다리꼴 모양으로 채널 단면에 조사된 빛의 산란이 심해 cell의 최대 광투과 거리에 제한이 있었다.

본 연구에서는 poly(dimethylsiloxane) (PDMS)를 사용하여 광 투과거리가 1000 μ m로서 채널 넓이(50 μ m)의 20배가 되는 광 투과 거리를 갖는 Z-cell 형태의 검출 셀을 갖는 흡광검출 칩을 개발하였다. PDMS chip은 네가티브 포토레지스트인 SU-8을 마스터로 사용하여 복잡한 구조물을 쉽고 신속하게

제작할 수 있으며 일단 패턴이 형성된 마스터를 제작하고 나면 약 50번 이상 반복적으로 chip을 대량으로 제작할 수 있다는 장점이 있다. 또한 광학적으로도 glass 보다 더 좋은 투과율을 가지며 수직 구조물을 제작할 수 있어 광 산란을 줄일 수 있다는 장점이 있다. [7]

3.2 시약 및 기기장치

3.2.1 시약

본 연구에 사용된 Fluoresceine과 FITC는 Aldrich사로부터 구입하여 아세톤에 1mM 농도로 녹인 후 완충용액으로 희석하여 사용하였다. 완충용액은 10mM tris (hydroxymethyl) amino methane/ 4mM boric acid를 물에 녹인 후 pH 9.0으로 조절하여 사용하였다.

3.2.2 기기 장치

Lab-on-a-chip에서의 용액 흐름 조절을 위해 고전압 공급장치 (MP5, Spellman High Voltage Electronic)와 고전압용 릴레이 (K45C332, Kilovac)를 사용하였고 기기의 조절은 LabView 4.0 프로그램과 Lab-PC-1200 multifunction I/O board (National Instruments)를 사용하여 컴퓨터로 컨트롤 하였다. 흡광검출을 위한 광원으로는 아르곤 이온 레이저 (488 nm, Lexel 95, Lexel laser)를 사용하였다. 시료를 통과한 빛은 광학필터 (488nm bandpass, 10nm bandwidth)를 통과시킨 후 광전증배관(HC120-01, Hamamatsu)으로 검출하였다. 데이터는 Autochro-Win 데이터 시스템 (v.2.0, 영린기기)으로 수집, 처리하였다.

3.3 칩 제작 방법

3.3.1 덮개용 PDMS chip 제작

흡광검출용 칩의 개략도는 그림 5와 같다. 덮개용 PDMS chip 제작을 위한 포토마스크로 50 μ m 넓이의 분리 채널과 광섬유를 삽입하기 위한 130 μ m 넓이의 광섬유 가이드 채널이 있는 포토마스크(마스크 1)와 광섬유 가이드 채널만 있는 포토마스크(마스크 2)를 제작하였다. 이후 네가티브 포토레지스트 (SU8-50, Microlithography Chemical.)와 PDMS를 이용한 칩 제작 공정은 그림 6과 같다.

우선 실리콘 웨이퍼 위에 SU-8을 20 μ m 두

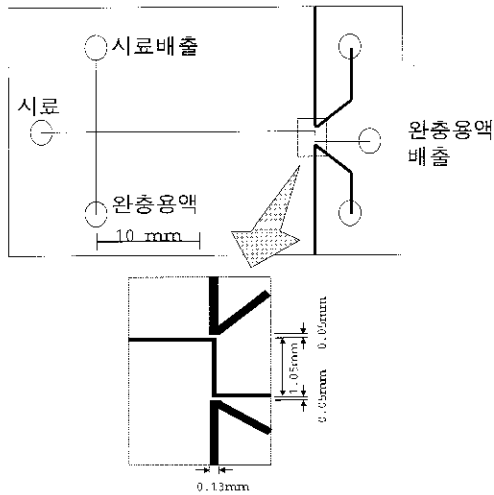


그림 5. 흡광검출용 PDMS chip의 개략도.

께로 스펀코팅 한 다음, 마스크 1을 위에 놓고 UV 노광(60초)하였다. 이 위에 한번 더 SU-8을 50 μm 두께로 코팅한 후 마스크 2를 cross-link 된 패턴에 일치시켜 UV 노광하였다. Propylene glycol methyl ether acetate로 SU-8을 현상하여 20 \times 50 μm 의 채널 구조물과 70 \times 120 μm 의 광섬유 가이드를 가진 SU-8 구조물을 제작하였다. PDMS prepolymer를 구조물 위에 부어 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5시간 가열한 다음 고형화시켰다.

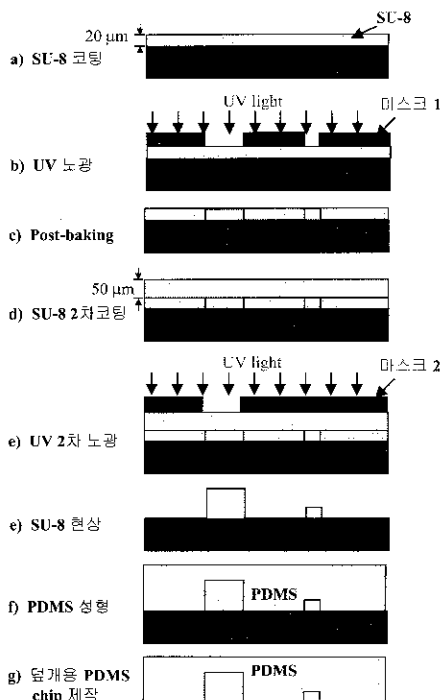


그림 6. 웰개용 PDMS chip 제작.

3.3.2 밀판용 PDMS chip 제작 및 접합

PDMS chip의 아래 판으로 사용하기 위한 PDMS plate는 광섬유 가이드 채널만 있는 포토마스크(마스크 3)를 사용하여 제작하였다. SU-8을 실리콘 웨이퍼 위에 50 μm 두께로 코팅한 후 마스크 3을 위에 두고 UV 노광하였다. Propylene glycol methyl ether acetate로 포토레지스를 현상하여 50 \times 120 μm 의 광섬유 가이드를 가진 SU-8 구조물을 제작하였다. PDMS prepolymer를 구조물 위에 부어 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5시간 가열한 다음 고형화시켰다.

웰개용 PDMS chip과 밀판용 PDMS chip들을 실리콘 웨이퍼에서 떼어낸 후 적당한 크기로 자르고 웰개용 chip의 분리 채널 끝에 용액 저장 용기용 구멍을 뚫었다. 두 chip의 표면을 코로나 방전 처리하여 산화시킨 후 두 칩의 광섬유 가이드 채널을 일치시킨 다음 접합하였다. 마이크로 시린지 팁을 적당한 크기로 잘라 용기용 구멍에 삽입한 후 PDMS 판에 접착시켜 흡광검출용 PDMS chip을 제작하였다.

3.3.3 광섬유 삽입

흡광 검출 cell에 빛을 조사하기 위한 광섬유는 125 μm 직경의 cladding과 3 μm 직경의 core를 갖는 광섬유(A)를 사용하였다. Cell을 통과한 빛을 받기 위한 광섬유는 125 μm 직경의 cladding과 50 μm 직경의 core를 갖는 광섬유(B)를 사용하였다. 각 광섬유는 광섬유 가이드 채널로의 삽입을 원활하게 하기 위해 불산/질산 혼합액(10:1 49% 불산, 70% 질산)으로 광섬유의 cladding을 10 μm 정도 에칭하였다. 광섬유는 현미경으로 보면서 chip 내의 광섬유 가이드 채널로 천천히 채널 끝까지 삽입하였다.

3.4 결과 및 토의

3.4.1 흡광 검출 chip 제작 및 실험

흡광 검출 chip에서 용액 이동 채널의 넓이는 50 μm , 깊이는 20 μm 로 제작하였고 광섬

유 가이드용 채널의 넓이는 130 μm , 깊이는 120 μm 로 제작하였다. 흡광 검출 cell의 길이는 1mm였으며 광섬유와 검출 cell까지의 거리는 50 μm 로 제작하였다. 시료 주입부에서 검출 cell까지의 거리는 20.5mm 였다. 흡광

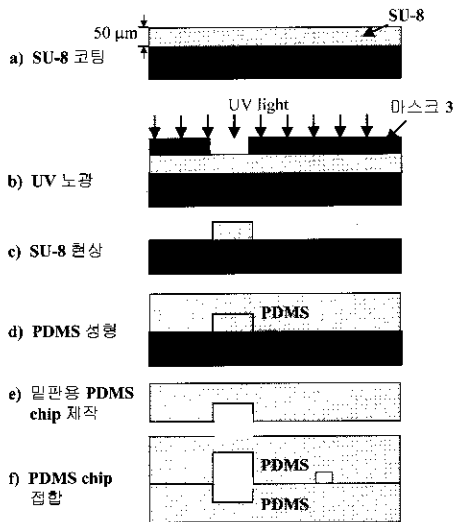


그림 7. 밀관용 PDMS chip 제작 및 집합.

검출 chip에서의 시료 주입 및 분리는 precolumn 반응 및 분리 실험에서와 동일한 전압 구성과 주입방법으로 수행하였다.

3.4.2 흡광 검출 cell의 흡광 효율

흡광 cell의 흡광 효율을 측정하기 위해 분리 채널 및 셀에 50 μM의 fluorescein을 채운 다음, 1mm의 흡광 셀에서의 흡광도를 측정하고 계산 값과 비교하였다. Beer의 법칙에 따르면 흡광도는 $A = \epsilon bC$ 로 표현된다. 여기서 A는 흡광도(absorbance), ϵ 는 몰 흡광계수($M^{-1}cm^{-1}$), b는 광투과 거리(cm), C는 시료의 농도(M)이다. Fluorescein의 몰 흡광계수(ϵ)는 $8.8 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ 이며, 흡광 cell의 길이(b)는 0.1 cm, 농도(C)는 $50 \times 10^{-6} M$ 이므로 계산 결과 흡광도는 0.438이다. 실제 실험한 결과 흡광도는 0.438로 계산 값과 비교할 때 99%의 매우 우수한 흡광 효율을 보였다.

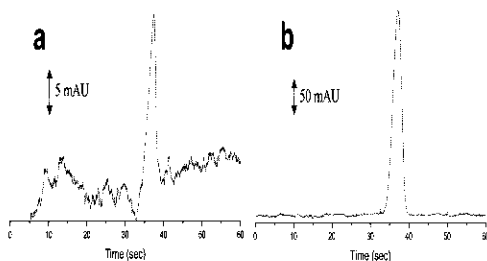


그림 8. 흡광 검출 cell의 흡광도 비교.
a: cell 길이 50 μm, b: cell 길이 1mm,

흡광 cell의 길이에 따른 흡광도를 비교하기 위해 50 μM의 fluorescein을 주입, 분리하여 50 μm 및 1mm의 흡광 cell에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과는 그림 8과 같으며 1mm의 광 투과거리를 갖는 흡광 cell에서의 흡광도는 50 μm 투과거리의 흡광 cell 보다 약 18배 정도 증가하였다.

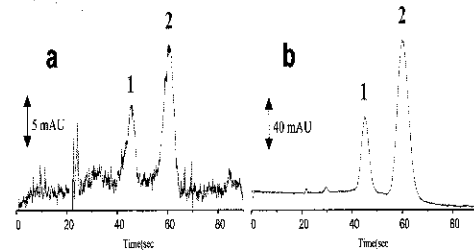


그림 9. 흡광 검출 chip에서의 시료 분리.
cell: 1mm, 1: FITC, 2: fluorescein, a: 5 μM, b: 50 μM.

3.4.3 시료 분리

FITC와 fluorescein 각 5 μM 혼합용액과 50 μM 혼합용액을 제조한 후 1 mm의 흡광 검출 cell에서 각 물질들을 검출하였다. 각 시료들의 분리 결과는 그림 9에 나타내었다. PDMS로 제작한 흡광 검출 chip에서 두 물질들은 잘 분리되었으며 1mm의 흡광 셀에서의 각 물질들의 검출 한계는 FITC는 5 μM, fluorescein은 1 μM 정도였다.

3.5 결 론

본 연구에서는 PDMS 재질의 플라스틱을 이용하여 흡광 검출용 lab-on-a-chip을 제작하였다. SU-8을 이용한 구조물 제작은 glass 보다 훨씬 용이하며 주형을 제작한 후에는 복잡한 구조의 채널도 쉽게 제작이 가능함을 보였다. 본 연구에서는 레이저를 사용하여 흡광 검출 cell의 효율을 측정하였으나 앞으로 다양한 파장의 빛을 사용하여 여러 가지 물질 분석 응용에 관한 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 흡광 검출에서 잡음을 줄이기 위한 방안 및 렌즈 등을 이용한 광원의 집광 방안에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

광섬유를 이용한 검출법은 간단하기는 하지만 만약 chip 내에 waveguide를 통합하여 제작할 수 있다면 chip을 훨씬 더 간단하게 제작할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 유전형 흐름을 이용한 칩

4.1 ESI-MS를 이용한 단백질 분석

세포의 신진대사(metabolism)에 대한 정확한 이해를 하기 위해서는 유전자의 분석(genomic analysis)과 단백질의 분석(proteome analysis)이 서로 보완적으로 이루어져야 한다. 최근 유전자에 대한 정보가 풍부해지면서 단백질 분석에 대한 관심이 높아지고 있으며 매우 빠르게 진보하고 있다. 현재 가장 대표적인 단백질 분석 방법은 2-D gel을 이용한 전기영동(electrophoresis)과 질량분석법(Mass spectrometry)의 조합이다. 그러나 이 방법이 가지는 우수성에도 불구하고 자동화되지 못한 분석으로 인하여 시간과 효율이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 따라서 방대한 양의 단백질 분석에 필요한 자동화된 분석법의 개발이 절실히 요구되고 있다. [8] ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry)는 대표적인 단백질 질량 분석법이다. 다른 질량 분석법에 비하여 시료를 유체로 주입할 수 있어 HPLC (high performance liquid chromatography)와 같은 분석 장비와 쉽게 연결해 사용할 수 있으며 매우 약한 이온화 방법으로 단백질과 같은 거대 분자의 분자량 측정에 유리하다. 그러나 일반적으로 단백질 시료를 취급하는데 사용하는 완충용액 속의 염(salts)에 의하여 감도가 나빠져 분해능이 감소하는 단점을 가지고 있다. 따라서 ESI-MS를 이용한 단백질의 분석에는 반드시 염을 제거하는 과정이 있어야 한다. 최근 자동화된 염제거 방법에 대한 연구가 다양하게 시도되고 있으며 특히 적은 양의 시료를 취급하는 Lab-on-a-Chip을 이용한 방법에 관심이 집중되고 있다. [9]

4.2 유전형 흐름

유전형흐름(laminar flow)이란 낮은 레이놀드 수(reynolds number)에서 물리적 장벽 없이 유체가 섞이지 않는 것을 말한다. 최근 유전형 흐름을 lab-on-a-chip에 적용한 예를 볼 수 있다. Lab-on-a-chip이 가지는 작은 면적으로 인하여 유체가 쉽게 유전형흐름을 만들 수 있다. 두 개 이상의 유전형흐름이 형성될 때 실제적인 섞임 현상이 계면에서의 확산(diffusion)에 의해서만 일어나고 이때 확산은 시료의 크기에 따라 다르게 일어난다.

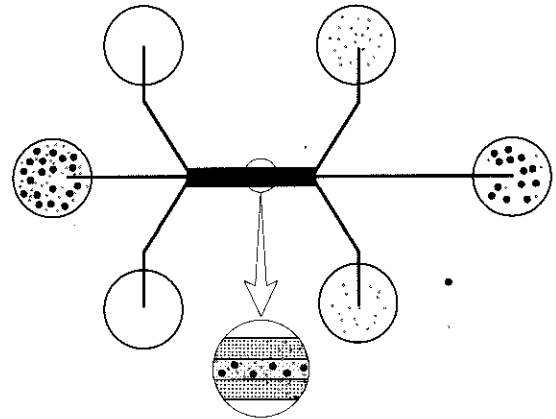


그림 10. 시료중 염제거 원리.

본 실험에서는 그림 10과 같은 구조를 가지는 칩을 제작하였다. 가운데 채널에서 ESI-MS를 이용해 검출할 단백질을 일정한 유속으로 흘려 보낸다. 이 단백질 시료에는 높은 농도의 염이 들어있다. 가운데를 제외한 양쪽 채널에는 일반적으로 ESI-MS에 사용되는 완충용액(buffer)을 흘려 보낸다. 세 채널에서 나오는 유체는 일정한 유속을 가지면서 유전형 흐름을 형성하게 된다. 가운데 채널에 있는 작은 분자량을 가지는 염은 확산에 의하여 양쪽 채널로 멀리 이동하고 상대적으로 큰 분자량을 가지는 단백질 시료는 적게 이동하게 된다. 출구에 만들어진 3개의 채널 중 가운데 채널로 염이 제거된 단백질 시료가 모아지고 양쪽 채널로 확산으로 제거된 염이 빠져나가게 된다.

4.3 칩제작 방법

Polydimethylsiloxane(PDMS)는 우수한 광학 성질과 제작의 용이성으로 인하여 최근 lab-on-a-chip 제작에 많이 사용되고 있다. 원하는 패턴을 computer aided design (CAD)를 이용해 설계한다. 입구의 채널 폭은 각각 100 μm 씩으로 정하고 중앙 채널은 300 μm 로 설계하였다. 시료가 나가는 출구는 중앙은 50 μm , 양쪽 채널은 125 μm 로 설계하였다. 설계된 디자인을 루비 필름에 20배 확대해 옮긴 후 에멀전 플레이트에 촬영한 뒤 현상하여 마스크(mask)를 제작한다. 실리콘 웨이퍼(silicon wafer)에 SU-8을 약 100 μm 의 높이로 스핀 코팅(spin coating)한다. 준비된 마스크를 통해 약 200초 정도 UV(365 nm)에 노출시킨 뒤 현상하면 원하는 디자인

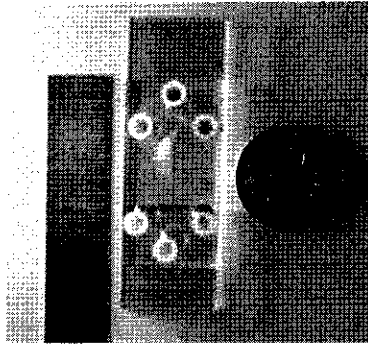


그림 11. PDMS 칩.

을 가지는 양각의 구조물을 얻게 된다. 이 구조물 위에 PDMS를 붙고 75°C에서 5시간 정도 가열하면 음각의 채널을 가지는 PDMS를 얻을 수 있게 된다. 필요한 위치에 구멍을 뚫어 놓은 유리판을 피라나(piranha solution)용액으로 1시간 정도 세척한 뒤 유리판과 PDMS 틀을 메탄올(MeOH)로 세척한다. 테슬라 코일(tesla coil)을 이용해 PDMS와 유리판의 표면을 처리하고 붙인다. 24시간 방치후 유리판 구멍에 용기(reservoir)를 에폭시를 이용해 붙여 그림 11과 같은 칩을 제작하였다.

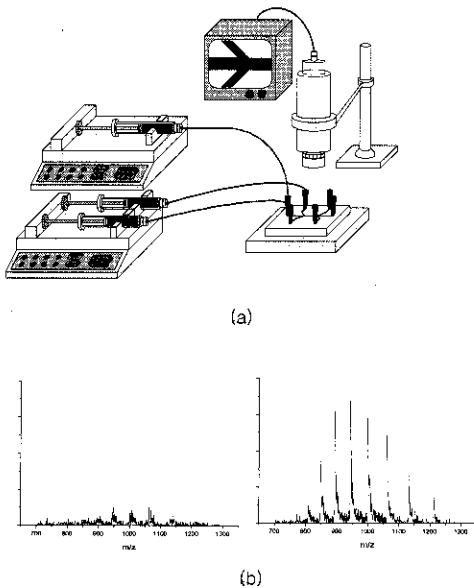


그림 12. a Off-line desalting system. b. off-line system에서 칩을 이용한 염 제거 전후의 ESI-MS Spectrum.

4.4 결과 및 토의

500 mM의 NaCl에 myoglobin을 1mg/ml 양으로 녹인다. Off-line 실험에서는 염을 제거

하기위한 완충용액으로 10 mM의 NH_4OAc 와 1%의 acetic acid를 사용하였다. myoglobin 시료를 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유량으로 시린지 펌프

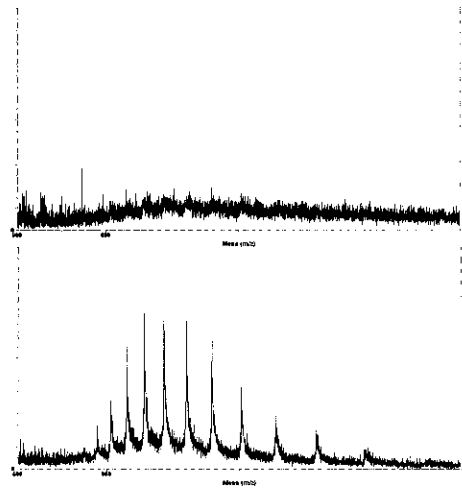


그림 13. On-line system에서 칩을 이용한 염 제거 전후의 ESI-MS spectrum.

(syringe pump)를 이용하여 주입한다. 이때 완충용액은 양쪽 채널을 통해 12 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유량으로 주입한다. 시료 채취용기에서 시료를 채취해 ESI-MS로 확인한다. 그림 12에서 볼 수 있듯이 염을 제거하지 않은 시료와 비교했을 때 신호대잡음비 (S/N)가 크게 향상되었으며 감도 또한 높아지는 것을 확인할 수 있다.

On-line 실험을 위하여 내경 76 μm 외경 366 μm 인 모세관을 주입구와 배출구에 연결한다. 지름 2 mm의 구멍을 유리판 위에 뚫고 외경 1/16 인치(inch)의 테플론관(teflon tubing)을 연결한다. 이 테플론 관에 모세관을 연결하고 붙인다. 완충용액과 시료는 HPLC 펌프(pump)를 이용해 주입한다. HPLC를 통해 0.5 μl 의 시료를 칩으로 주입하고 HPLC 펌프로 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유량으로 밀어 넣는다. 완충용액은 12 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유량으로 주입한다. 배출구의 모세관은 직접 ESI-MS에 연결되어 주입된다. 그림 13에서 볼 수 있듯이 0.5 μl 의 적은 시료 양으로 매우 높은 감도를 가지는 결과를 얻을 수 있다.

5. 결 론

지금까지 lab-on-a-chip에 응용된 다양한 개념을 보았다. precolumn 반응 및 분리능

기존 분석장비가 가지는 제약성을 lab-on-a-chip을 사용하여 간편하고 매우 높은 효율로 수행한 결과를 보았다. SU-8을 이용한 구조물의 제작은 glass 보다 훨씬 용이하며 정교하고 복잡한 구조를 쉽게 제작할 수 있었다. 광섬유를 이용한 흡광 검출법은 칩 내에 waveguide의 적용 가능성을 보여 주었다. 또한 단백질 시료 전처리 칩은 기존의 거대 장치 사이에서 lab-on-a-chip이 수행할 수 있는 새로운 가능성을 제시하였다.

그러나 lab-on-a-chip이 추구하는 목표를 수행하기 위해서는 기존의 방법이 가지는 한계를 극복해야한다. 미세 채널에서의 유체흐름 제어는 현재까지 제시된 전기삼투흐름으로 완성될 수는 없다. 이를 극복할 수 있는 가장 큰 대안은 칩 내에 미세 구조물을 만들어 놓는 일이다. MEMS 기술의 도입은 복잡하며 정교한 구조물 제작을 가능하게 할 것이며 동시에 유체의 흐름을 좀더 정교하고 확실하게 조절할 수 있게될 것이다.

다양한 분석법에 적용할 수 있는 칩 개발은 화학, 생명, 제약뿐 아니라 기계, 전자, 전기 등 관련 분야의 기술들이 집적되어야만 결실을 얻을 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- [1] D. Figeys and D. Pinto, "Lab-on-a-Chip: A Revolution in Biological and Medical Sciences," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 330A-335A, 2000.
- [2] J. M. Ramsey, "The burgeoning power of the shirinking laboratory," *Nature Biotechnology*, vol. 17, pp. 1061-1062, 1999.
- [3] 노경원, 임관섭, 한종훈, "칩위의 실험실 (Lab-on-Chip): μ -TAS (Micro-Total Chemical Anaysis System)," *화학세계*, 제 39권, 제9호, pp. 34-42, 1998.
- [4] S. C. Jacobson, R. Hergenroder, A. W. Moore, Jr. and J. M. Ramsey, "Precolumn Reaction with Electrophoretic Analysis Integrated on a Microchip," *Analytical Chemistry*, vol. 66, pp. 4127-4132, 1994.
- [5] I. Rodriguez, H. K. Lee and S. F. Y. Li, "Microchannel electrophoretic separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography," *Electrophoresis*, vol. 20, pp. 118-126, 1999.
- [6] Z. Liang, N. Chiem, G. Ocvirk, T. Tang, K. Fluri and D. J. Harrison, "Micro-fabrication of a Planar Absorbance and Fluorescence Cell for Integrated Capillary Electrophoresis Devices," *Analytical Chemistry*, vol. 68, pp. 1040-1046, 1996.
- [7] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. j. A. Schueller and G. M. Whitesides, "Fabrication of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 27-40, 2000.
- [8] M. F. Lopez, "Better approaches to finding the needle in a haystack : optimizing proteome analysis through automation," *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 1082-1093, 2000.
- [9] N. Xu, Y. Lin, S. A. Hofstadler, D. Matson, C. J. Call and R. D. Smith, "A Microfabricated Dialysis Device for Sample Cleanup in Electrospray Ionization Mass Spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 3553-3556, 1998.
- [10] B. H. Weigle and P. Yager, "Microfluidic Diffusion Based Separation and Detection," *Science*, vol. 283, pp. 346-347, 1999.