

# 나노기술을 이용한 미세 바이오 분석시스템

강주현, 박제균 / 한국과학기술원 바이오시스템학과

최근 바이오산업은 인간 유전체 프로젝트의 성과에 힘입어 급속히 발전하고 있다. 유전자 및 단백질의 기능 연구를 통해 우리는 그동안 갈구해 왔던 인간의 질병 연구 및 치료제 개발에 필요한 실마리를 얻을 수 있기 때문이다. 생물학 연구도 이제는 단위 생물 개체를 총체적으로 접근할 수 있는 시스템적 연구를 필요로 하고 있으며, 연구 방법 또한 소량의 실험재료로서 다량의 실험을 동시에 수행할 수 있는 새로운 접근을 필요로 하고 있다. 바이오산업은 의약품, 화학, 식품, 환경, 농업, 에너지 관련 산업뿐만 아니라 전자, 전산 및 기계 분야 등 전 분야에 걸쳐 파급 효과가 큰 융합 과학의 산물로서 발전되고 있다.

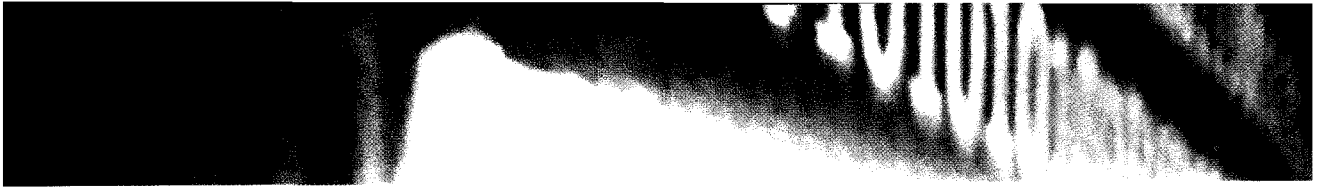
나노기술을 이용하면 나노스케일로 정의되는 물리, 화학, 생물학적 구조 및 현상을 토대로 지금까지 해결해지 못했던 새로운 과학 현상을 규명하고, 우리가 상상해 그쳤던 초 미세 구조체를 설계 제작할 수 있다. 특히, 나노기술과 생명공학 기술의 융합 분야인 나노바이오공학 기술은 지금까지 단편적으로 간주되고, 관찰되어 왔던 생명현상을 총체적인 관점에서 해석할 수 있는 새로운 수단을 제공하고, 이를 공학적으로 응용할 수 있는 새로운 기회를 제공해 줄 수 있다. 나노바이오공학이란 자연계에 존재하는 생물학적 현상으로부터 공학적 현상을 추출하고, 응용하는 과정을 통해 융합과학의 새로운 패러다임을 창출할 수 있는 분야이다. 생물학적 연구를 위해 공학적 해법과 도구를 도입하고, 새로운 공학적 목

표를 위해 생물학적 지식을 적용한다. 이는 생명공학기술과 나노기술의 발전에도 상호 보완적인 관계에 있다.

예로서, 바이러스와 같은 생체 분자 등의 미세 조작 및 나노구조물 상에서의 단백질과 세포반응 해석과 같이 나노스케일의 세포생물학과 생화학에 대한 연구를 비롯하여, 나노캡슐을 이용한 약물전달시스템, 나노입자액을 이용한 치료제, 생체분자의 미세 분석기술 개발, 질병진단 기기 개발에 쓰일 수 있는 분자 필터 및 세포 분리 연구, 신약 후보물질을 스크리닝 하거나 신경 재활공학적인 연구에 기반이 되는 생체물질 표면 패터닝 연구, 생체삽입용 칩 개발, 분자인식 기능이 있는 분자 주형체 개발, 생체내 에너지원만을 이용하여 구동이 가능한 분자 모터 연구 등 다양한 연구산물이 기대되고 있다.

여기서는 생체분자 미세 분석 기술에 대해서만 자세히 알아보기로 한다.

생명현상의 이해 및 공학적 응용을 위해서는 미량으로 존재하는 생체분자를 측정할 수 있어야 한다. 생물학적 검출기술은 다량의 바이오정보를 일차적으로 획득하는 수단으로서 그리고, 질병의 예방, 진단 등 산업적 응용이라는 측면에서도 매우 중요하다. 시스템적 생물학 연구가 진행되기 위해서도 다량의 시료를 동시에 상호 비교 분석할 수 있는 도구



가 있어야 한다. 최근 바이오 산업에서 미세 바이오 분석 시스템 개발의 필요성은 유전체 및 단백질 연구와 신약 개발 등에 있어 큰 의미를 갖고 있다. 분석, 진단 및 신약개발 시 소요되는 비용의 절감과 대량검색의 고효율성이라는 장점을 제공해 줄 수 있기 때문이다.

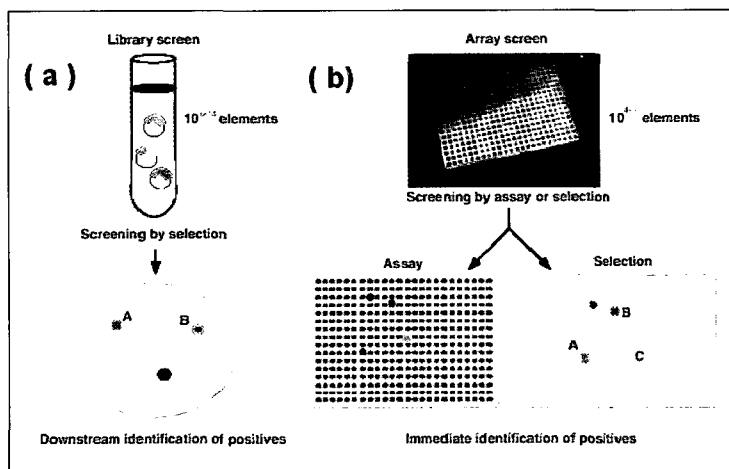


그림 1 (a) Test tube를 이용한 실험 방법과 (b) 바이오 어레이 개념의 비교 [1]

바이오 분석 시스템이란 일반적으로 바이오센서, 바이오칩, 랩온어칩(lab-on-a-chip), HTS (high-throughput screening) 시스템, 임상 분석기 등을 의미한다. 이러한 바이오 분석 시스템은 다량의 시료를 처리할 수 있도록 어레이(array)화 및 소형화(miniaturization) 되어 가고 있는 것이 지금의 큰 흐름이다. 즉, 나노기술의 접목은 필수가 되었다.

먼저 바이오칩 등에서 사용되고 있는 어레이의 개념을 바이오칩의 예로 설명하기로 한다. 지금까지 개개의 시험관에서 하던 일련의 생화학적 실험을 바둑판 모양의 초소형 미세 반응기가 구현된 칩을 통해 동시에 수행할 수 있다는 것이 바이오칩의 개념이다(그림 1). 바이오칩 중 단백질 칩(protein chip)은 특정 단백질과 반응할 수 있는 수십에서 수백 종류 이상의 서로 다른 단백질이나 리간드 등을 고체(금속, 유리, 플라스틱 등) 표면에 미세어레이화시킨 후, 이들과 특이적으로 상호 반응하는 생체분자

의 존재, 또는 기능 및 역할을 형광, SPR (surface plasmon resonance), 질량분석기 등의 여러 가지 분석방법을 이용하여 대량으로 신속하게 분석하는 장치를 의미한다. 이러한 단백질 칩은 단백질만이 갖는 고도의 선택성과 칩이라는 관점에서의 대량 스크리닝 기능이 있기 때문에 단백질의 분리, 확인, 정량

및 기능 해석에 이르는 일련의 단백질 분석작업을 칩상에서 수행할 수 있는 잠재성이 있고, 질병의 원인 규명을 유전자 수준에서 단백질 수준까지 확대 규명하는 단백질체학(proteomics) 연구 분야와 진단용 바이오센서 분야에 널리 활용될 전망이다 [1].

이와 같이 미세한 어레이 형태의 바이오칩을 제작하기 위해서는 미세 가공기술과 소량의 바이오 시료를 검출, 분석하기 위한 고감도의 측정기술이 절실히 필요하다. 미세가공기술에 대해서는 후반부에서 설명하기로 하고, 먼저 나노기술을 활용한 바이오센서의 연구

에 대해 알아보자. 현재, 나노스케일의 실리콘 선, 금 나노입자 (gold nanoparticle), 나노유체제어기술(nanofluidics), 분자인쇄 (molecular imprinting), 나노바코드 (nanobarcode), 나노튜브 (nanotube) 등을 이용한 다양한 연구시도가 이루어지고 있다.

대부분의 바이오칩 분석에 있어서 레이저 유발 형광법(laser induced fluorescence)을 이용한 스캐너를 많이 사용하고 있다. DNA 및 단백질간의 결합반응만으로는 전기적 신호를 얻을 수 없기 때문이다. 이 경우 측정하고자 하는 시료를 미리 형광을 내는 물질과 결합시켜 어레이화 된 생체물질과 반응시키게 되면 결합된 부위의 형광 유무를 측정함으로써 생화학반응 정도를 판가름 할 수 있게 된다. 그러나 이러한 형광 측정법은 값비싼 레이저를 이용해야 하고, 초 미세 어레이 시스템에는 적용하기 어려운 단점이 있다.

미국의 Northwestern 대학 연구팀은 금 나노입자

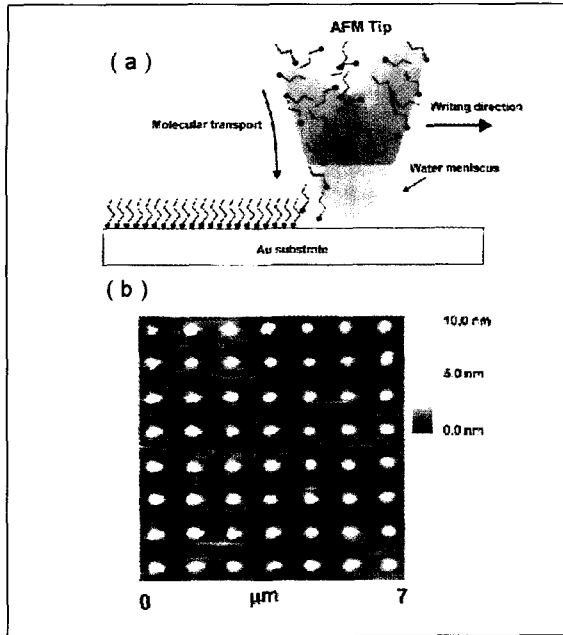


그림 2 (a) AFM tip을 이용한 dip-pen nanolithography의 개념도 및 (b) 제작된 단백질 나노어레이의 패턴이미지 [2]

를 이용한 검출법에 대한 연구를 활발히 진행 중이다. 전극간의 간격이 20 μm에 불과한 실리콘 표면에 DNA 프로브를 붙여놓고, 시료용액 중의 DNA와 혼성화(hybridization) 될 때 금 나노입자를 미리 붙여준 신호 프로브를 사용하고, silver 용액을 이용하여 두 전극간에 전류가 흐를 수 있는 경로를 형성시킨 DNA 검출용 나노센서를 개발하고 있다. 또한, 연구팀은 나노어레이 제작에 생체분자를 관찰하는데 많이 사용되고 있는 AFM(atomic force microscope) 기술을 이용했다. 이 방법을 Dip-Pen nanolithography 라고 한다 (그림 2). 고밀도, 고집적의 나노어레이 제작을 위해서는 기존 로보틱스 형태의 어레이어로는 한계가 있기 때문에 이러한 생체물질의 패터닝 기술은 미세 바이오칩 제작에 대단히 중요한 기술로 평가되고 있다. AFM을 이용하면 분자단위의 조작성이 가능해지기 때문에 항체 등의 생체분자 조작성을 용이해 단백질 나노어레이의 제작이 가능해진다. 또 다른 전기적 검출법으로서 미국의 하버드 대학 연구팀은 직경 10 nm인 실리콘 전선

표면에 질병관련 단백질을 검출할 수 있는 분자를 코팅하여 혈액 중에 존재하는 단백질이 실리콘 전선에 붙게 되면 실리콘전선의 전도도 변화를 유발해서 전기적 신호로서 단백질을 검출할 수 있는 새로운 연구를 진행하고 있다. 그밖에 single-walled carbon nanotubes (CNT)를 이용하여 CNT 표면에서 분자흡착에 의한 화학반응결과 CNT의 저항변화를 유발해 낼 수 있는 고감도 소형의 화학/바이오 센서에 대한 연구도 진행되고 있다. 이러한 전기적 측정법의 가장 큰 장점은 시스템 집적화 및 소형 분석시스템 구축에 유리한 장점이 있다.

한편, 나노입자를 형광물질 대신 사용하는 검출방법도 있다. 금(gold) 나노입자는 크기에 따라 서로 다른 색을 낼 수 있기 때문에 다른 종류의 DNA를 서로 다른 크기의 금 나노입자에 붙인 후 혼성화를 검출하는 방법도 제시된 바 있다. 유사한 예로 Quantum Dot는 크기와 물질에 따라 광학적 성질이 변하는 nanocrystal을 이용한 laboratory-on-a-bead 기술을 개발하였다. Cadmium selenide와 같은 수용성의 형광을 발하는 semiconductor crystal을 이용하면 5-10 nm 크기의 나노입자를 제조할 수 있고, 이들 나노입자는 넓은 파장대의 자외선을 흡수하여 크기별로 다양한 색을 낸다. 이러한 색의 변화를 측정함으로써 다성분 분석이 가능하여 어레이 구조의 칩을 분석하는데 매우 유용하게 쓰일 수 있다. 일반적으로 유기물로 이루어진 형광물질의 경우 화학적으로 불안정하고, 특정 파장의 레이저를 이용하여 형광을 유발시켜야 하지만 이러한 나노입자의 경우 레이저가 없이도 쉽게 여기(excitation)될 수 있어 측정장치가 간단해지는 장점이 있고, 고감도의 분석능을 보여주어 널리 활용될 전망이다.

나노입자를 이용하면 위와 같은 어레이 개념의 분석대신 “solution array” 형태의 분석도 가능해진다. 이 기술은 나노어레이 제작 어려움의 한계를 극복할 수 있는 대안으로 주목을 받고 있다. 즉, 이차원 평면상에 생체물질을 일일이 어레이화하는 대신 비드나 나노입자를 제작하여 그 표면에 형광물질이 붙어

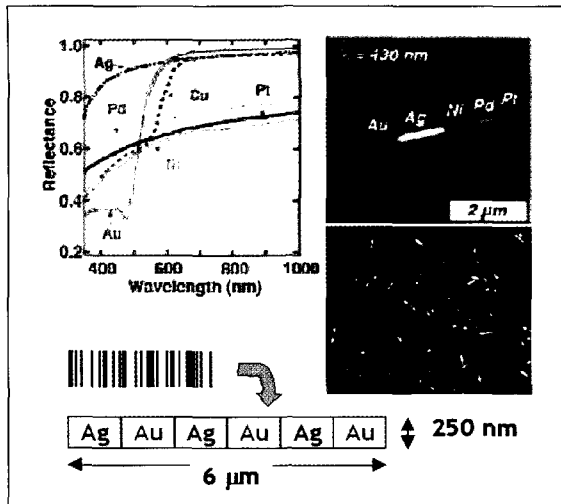
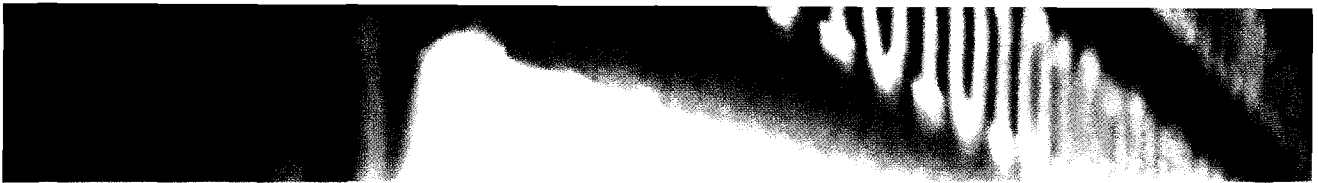


그림 3 Nanoplex 사가 개발한 나노바코드 입자 [3]

있는 생체물질을 코팅한다. 이 경우 비드 또는 나노입자의 색을 측정함으로써 어떤 생체 분자가 반응에 관여하는지를 알 수 있고, 입자 표면의 형광을 측정함으로써 생화학반응 여부 및 정도를 알 수 있다. 이러한 실험의 경우는 반응용액에 생체분자가 코팅된 나노입자를 한꺼번에 섞어서 반응시킬 수 있어 대량의 바이오시료 분석에 용이한 장점이 있다. 예로서, 나노 바코드(nanobarcode) 개념을 이용한 측정법을 살펴보자.  $Al_2O_3$  membrane 상에 형성된 pore 에 금속이온을 전기도금시켜 길이  $6\mu m$ , 직경  $250nm$  인 나노바코드를 구현하게 되면 위에서 설명한 바와 같이 기존의 DNA 분석, 면역 분석 등에 활용할 수 있다 [3]. 즉, 금속이온이 도입된 나노입자의 경우 특정 파장에서 서로 다른 광학특성을 보이게 되므로 금속이온 종류의 수만큼 다양한 바코드(barcode) 패턴을 얻을 수 있다 (그림 3). 세가지 금속이온을 도입하면 80,000가지의 패턴을 얻을 수 있어 수 만종의 시료를 동시에 분석할 수 있게 된다.

다음으로 바이오 분석 시스템의 또 다른 발전 방향인 소형화에 대해서 알아보자.

전술한 바와 같이 최근의 생명공학 산업은 바이오

유체제어기술과 대량검색기술이 결합된 소형화기술이 부가되면서 기존 생물학연구에 전자, 전산, 기계 등의 주변 기술이 급격히 융합되고 있는 데 특징이 있다. 특히, 유전자 분석 등의 바이오 분석법에 있어서 최근의 동향은 미세분석시스템을 구축하는데 있다. 소형화에 따른 분석시스템의 집적화로 시료량을 줄이고 가격을 낮추면서 자동화가 용이하기 때문이다. 이러한 미세분석시스템에 대한 연구는 스위스 Ciba Geigy 사의 Widmer 박사 그룹(1990)에 의해 제창된 micro-total analytical system ( $\mu$ -TAS) 개념에 기초를 하고 있다.  $\mu$ -TAS 는 시료 채취 영역, 미세유체회로, 검출기 및 이들을 제어할 수 있는 controller 로 구성된다. 이러한 연구는 미세 바이오센서, 바이오칩, 랩온어칩(lab-on-a-chip) 등의 기술 발달로 이어지고 있다.

소형의 미세 분석 시스템을 구축하기 위해서는 BioMEMS 기술이 중요하다. BioMEMS란 MEMS (Micro Electro Mechanical System) 기술을 바이오 산업에 응용하려는 분야이다. MEMS 또는 MST (Micro System Technology) 로 불리는 기술은 반도체 공정기술을 기반으로 하는  $\mu m$ 에서 mm 스케일의 초소형 정밀기계 제작기술을 의미한다. 이러한 MEMS 기술을 의료 및 생명공학 분야에 있어서 새로운 치료 및 진단기술 개발 등에 활용하기 위한 시도로서 발전되고 있는 영역이 BioMEMS 분야이고, 바이오유체제어 소자 기술은 이러한 BioMEMS 분야에서 가장 중요한 핵심기술이 되고 있다.

바이오유체제어 기술 (biofluidics) 이란 플라스틱이나 유리, 실리콘 등의 표면에 용액이 흐를 수 있는 미세 채널로 회로를 만들어 시료의 전처리, 분리, 희석, 혼합, 생화학반응, 검출 등을 하나의 칩에 소형화, 집적화 시키는 기술이다. 특히 바이오 관련 물질의 미세유체제어는 시료의 전처리 과정 (예로서, DNA를 생체로부터 분리하여 정제하고 증폭하는 과정과, 항원 및 항체간의 면역반응에 있어서 반응 및 세척 과정 등) 및 일련의 분석단계를 조절하는 데 있어 매우 중요하다. 이러한 기술은 생체시료와 시약

의 양을 줄이고, 많은 시료를 자동으로 한번에 처리해서 생리활성 물질을 대량으로 검색하기 위한 시스템 구축 등에 유리하다.

바이오유체제어기술의 가장 원천이 되는 기술은 미세채널 내의 용액을 이송하는 기술이다. 이 분야에서 가장 선도적인 기업은 미국의 Caliper Technology사로 미세채널의 양단에 고전압을 걸어 발생하는 전기이동흐름을 이용한 펌프로 유체를 이송하는 기술을 보유하고 있다. 1992년 Harrison 등에 의해 개발된 모세관 전기이동을 이용한 방법은 별도의 펌프나 밸브 없이 용액의 흐름을 제어하는 기술로 최근 활발히 연구되고 있다. 전기영동(electrophoresis) 및 전기삼투압(electroosmosis)의 원리를 이용한 유체의 흐름제어는 유체의 방향으로 수백 V/cm의 전기장을 걸어줄 때 유체와 마이크로채널간의 인터페이스에서 전하분리가 일어나는 것을 이용한다. 중성 pH 하에서 유리관이나 실리콘 채널 내벽은 H<sup>+</sup> 이온을 방출하고 음전하를 띤 silanol 그룹이 형성되는데, 전기장을 걸어주게 되면 이것이 유체를 움직이는 원동력으로 작용하는 것이다. 또한, 미세유체 채널내에서의 층류(laminar flow)로 인한 분자 확산(diffusion) 현상을 이용하는 기술이 개발되었다. 미국의 Micronics사는 이 기술을 이용해서 혈액을 직접 분석할 수 있는 기술을 개발하였고, 크레딧 카드 크기의 플라스틱에 미세유체회로를

집적하여 확산을 이용한 혈구와 혈장의 분리로 혈장 내의 효소, 단백질, 전해질, 약리물질 등을 분리 분석을 시도하였다. 그밖에 개발되고 있는 바이오유체제어 기술로는 Tecan과 Gyros 사의 원심력을 이용한 방법과 UCLA 등에서 개발 중인 electro-wetting 방법<sup>[4]</sup> 등이 있다(그림 4).

이러한 미세 분석시스템은 제약산업에서의 신약 개발용 생리활성물질 스크리닝 시스템과 진단용 분석시스템의 개발 니즈에 맞추어 활발히 연구가 진행되고 있다. 최근 미국 BioTrove 사는 Living Chip™ Screening System이란 Ultra high throughput ELISA 카드리지를 상용화 하였다(그림 5). 이 카드리지는 기존의 96 well plate보다 256배의 집적도를 갖는 24,576 well을 갖고 있다. 다시말해 이 카드리지는 한번에 24,576가지의 실험을 동시에 수행시킬 수 있다는 것이다. ELISA란 효소를 이용한 면역 분석법의 대표적 방법으로 생화학 실험에 있어 널리 사용되는 방법인데 보통 96 well, 384 well 형태의 microplate를 많이 사용하고 있다. microplate가 점점 소형화, 고집적화 되어감에 따라 1,536 well 시스템까지 개발되어 throughput을 높일 수 있게 되었지만, 기존 시스템은 시료의 주입과 분석에 있어 고가의 자동화된 기기를 필요로 하고 있어 근본적으로 throughput 증가에 한계가 있다. BioTrove 기술은 24,576 well을 갖는 microplate 두 개를 서로 겹쳐지게 하여 각각의 well에 함유된 시약과 시료가 상호 대응되는 well에서 혼합반응이 일어나도록 함으로서 시료주입 문제를 해결하였다<sup>[5]</sup>.

한편, Silicon Biosystems 회사는 dielectrophoresis (DEP)를 이용해 세포와 microbead들을 dielectro-phoretic cage안에 위치시켜서 전기적으로 세포와 microbead의 위치를 조절할 수 있는 원리를 이용한 DEPArray™를 개발하였다(그림 6). 이를 이용하면 microbead에 항체나 세포에 영향을 줄

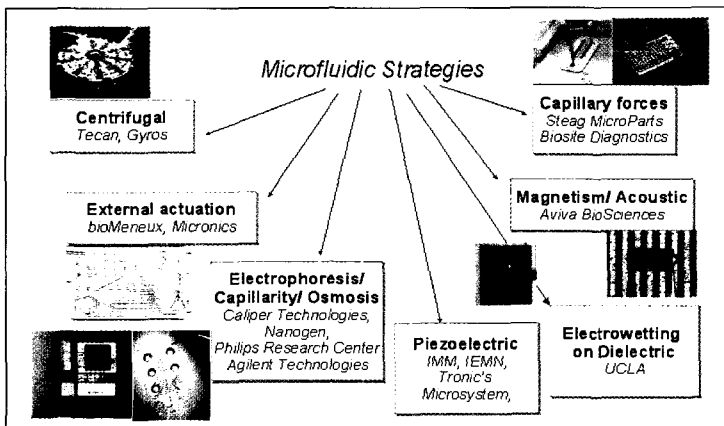


그림 4 미세 분석시스템에서 이용되고 있는 유체제어 기술의 예

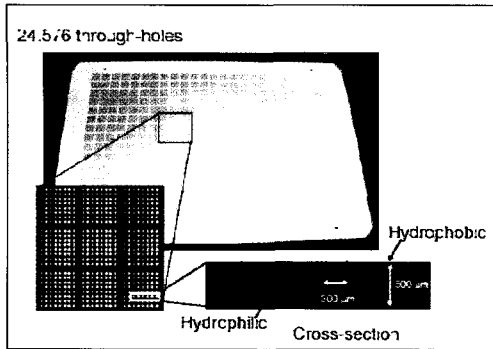
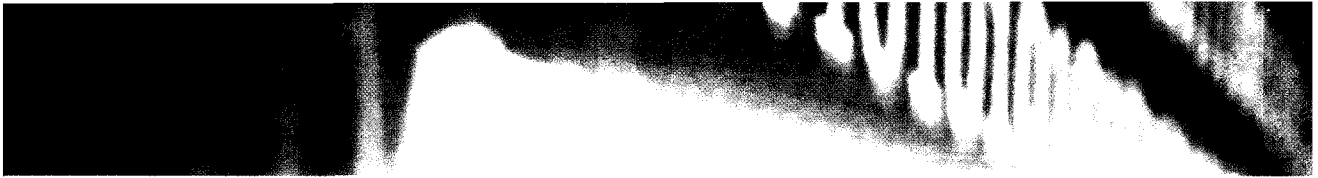


그림 5 24,567 well을 갖는 nanoliter plate [5]

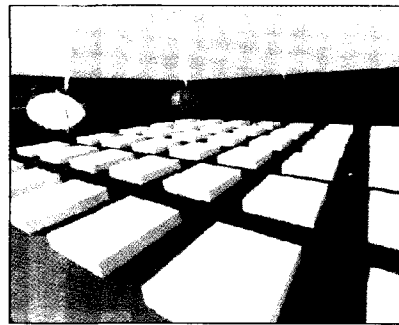


그림 6 Dielectrophoresis를 이용한 DEPArray 개념의 도식도 [6]

electrophoresis(CE) 용 microplate [7]로 기존의 96well type의 micro-plate array 배열을 이용하여 미세 채널 상에서 시료분 석이 병렬 처리되도록 하여 시료 분석의 시간과 비용을 줄여주는 효과가 있을 것으로 기대하고 있다.

수 있는 호르몬과 같은 물질을 붙여서 세포와 미지의 물질간의 상호작용에 대한 연구를 할 수 있다. 이 기술은 전극과의 접촉 없이 또한 채널이 없는 상태에서 전기적 변화에 의해 세포와 microbead의 움직임을 조작할 수 있는 장점이 있다. 이미 알고 있는 세포와 미지의 물질이 붙어있는 microbead와 상호작용을 관찰하는 신약물질 선별과정과, 반대로 미지의 세포와 이미 기능을 알고있는 물질이 붙어있는 microbead와의 상호작용 등을 관찰하는 진단에 사용이 가능하다 [6].

이러한 미세유체제어기술이 겸비된 HTS 용 플랫폼 기술은 현재 대부분의 BioMEMS 관련 회사에서 개발에 역점을 두고 있는 기술 중의 하나이다. 값싼 플라스틱을 재질로 엠보싱공정에 의해 마치 도장을 찍듯이 원하는 유체패턴을 제작할 수 있기 때문에 이러한 플라스틱 미세가공기술은 당분간 바이오 산업에 가장 널리 활용될 전망이다. 그림 7 은 독일의 Greiner Bio-One 사가 개발 중인 capillary

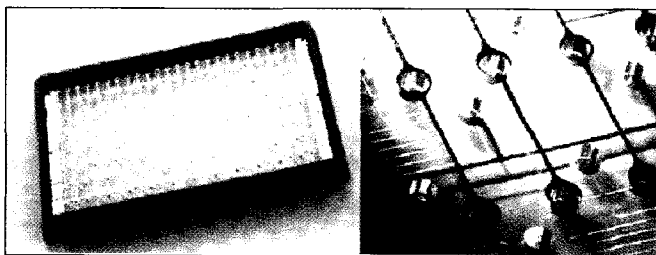


그림 7 CE용 전극이 집적화된 96 well 형태의 microfluidic plate [7]

#### [참고 문헌]

[1] Emili1,A.Q., Cagney,G. (2002). Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays, Nature Biotechnology, 18: 393-397.  
 [2] Lee,K.B., Park,S.J., Mirkin,C.A., SmithJ.C., Mrksich,M. (2002). Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography, Science 295: 1702-1705.  
 [3] Nicewarner-Pena,S.R., Freeman,R.G., Reiss,B.D., He,L., Pena,D.J., Walton,J.D., Cromer, R., Keating,C.D., Natan,M.J. (2001). Submicrometer metallic barcodes, Science 294: 137-141.  
 [4] Kim, C.J “CJ” (2003). Re-configurable digital microfluidics, BioMEMS 2003, San Jose, June 15-17, U.S.A.  
 [5] Kanigan,K. (2003). Living chip technology, Mainstreaming Microfluidics, Boston, May 15-16, U.S.A.

[6] Manaresi,N. (2003). A programmable lab-on-a-chip for individual cell-biology, Mainstreaming Microfluidics, Boston, May 15-16, U.S.A.

[7] Gerlach,A. (2003). Plastic microfluidic platforms for high-throughput applications, Mainstreaming Microfluidics, Boston, May 15-16, U.S.A.