

단백질 칩을 위한 분석방법 동향 III

- 모세관 전기영동법과 레이저 유발형광 검출기법

최정우

서강대학교 화학공학과

혁신적으로 발전한 소형화, 자동화 기술은 인간 생활에 많은 변화를 가져오게 되었다. 이미 DNA chip의 실용화를 눈앞에 두어, 유전자 변이에 기인한 질병진단에 응용되고 있으며[1], 현재의 추세대로 자동화와 소형화기술의 진전이 이루어지게 된다면 2010년의 진단, 검사장치는 현재까지 우리가 사용하던 검사기기와는 전혀 다른 형태가 될 것으로 예측할 수 있다. 현재까지 개발된 기술을 근거로 향후 10년 후의 검사장치를 예측해 본다면, Lab-on-a-Chip에 근거한 시스템 개발이 가능할 것으로 사료된다. Lab-on-a-Chip이란 유리, 실리콘, 또는 플라스틱으로 된 수 cm^2 크기의 chip위에 분석에 필요한 여러 가지 장치들을 반도체 가공기술에 사용되고 있는 미세가공기술(microelectromechanical systems; MEMS)등을 이용하여 집적시킨 초소형 화학프로세서이다[2]. 이러한 시스템은 시료채취, 전처리, 분리와 측정과정을 통합하여 휴대가 가능한 시스템을 제작할 수 있고, 가격이 싸다. 소형화된 시스템은 확실히 시료의 소비가 적고, 고안이 잘 되어 있다면 분석 시간도 단축할 수 있을 뿐만 아니라, 우수한 분리 효율을 얻을 수 있다.

Lab-on-a-Chip기술은 1964년 Pun과 Lombrozo에 의해 최초로 개발된 마이크로 스케일 전기영동장치를 기반으로 하여[3], 1980년대 이후에 개발되기 시작한 biochip등으로 불리는 microchip(DNA chip, protein chip 등)의 개발과정을 통해, 개발자들로 하여금 초소형의 램프나 filter등의 소형 부속이 부착된 플라스틱, 유리, 실리콘 등의 chip이나 유체흐름을 통제하는 전자회로 등의 개발이 유도되면서 가시화 되었다. 그 중 검사업무와 관련된 pocket-size의 완전자동기능을 갖춘 분석기로는 일련의 임상화학적 검사 (ex. blood gas, electrolytes)를 수행하거나, 또는 병상에서 혈당검사를 수행하는 "i-STAT"을 최초의 Lab-on-a-Chip으로 간주하는데, 이러한 초소형의 분석기는 Disposable cartridge 속에 장착된 chip에 두세 방울의 혈액으로 2-3분 이내에 검사결과를 산출이 가능하다[4]. 현재 연구개발 중의 상황하에서도, 미국내 약 1,200개 병원에서 microchip을 이용하고 있다. 향후 시장전망을 예측할 수 있는 하나의 지표가 될 것이다.

길이가 1/10로 줄어든다는 것은 흐름의 속도가 10배 빨라져서 시간이 1/10이 되는 것을 의미한다. 이것은 시료의 소비가 1/10으로 줄어든 것을 의미하나, 유전형 흐름일 경우에는 압력이 줄어드는 정도가 100배이다. 이것은 HPLC과 같은 분석법을 적용시키는데 한계를 갖는다. 때문에 Gas Chromatography나 Liquid Chromatography는 분리법으로 배제되고 전기적인 힘으로 분리하는 모세관 전기영동법(Capillary Electrophoresis; CE)과 우

수한 검출능을 가지는 레이저 유발형광(Laser-Induced Fluorescence; LIF) 검출법을 이용한다[5]. 이러한 경우 효율의 증대와 분석시간의 단축을 가져온다. 본 고에서는 Lab-on-a-Chip 개발에 널리 이용되고 있는 분석기법인 모세관 전기영동법 (CE)과 레이저 유발형광 (LIF)검출법을 소개한다.

(1) 모세관 전기영동 (Capillary Electrophoresis; CE)

많은 분자들은 수용액에서 양전하나 음전하를 띠고 있는데, 이때 외부에서 전기장을 걸어주면 각 이온들은 반대 전하를 띤 전극으로 이동하게 된다. 모세관에서는 이온을 띤 물질의 분리에 기여하는 두 가지 유체의 움직임이 있다. 전기영동적 흐름(electrophoretic flow)과 전기삼투적 흐름(electroosmotic flow; EOF)이 그것이다. Electrophoretic flow는 전하를 띤 용질이 반대 전하의 전극으로 이동해 감을 말한다. 이에 반해 EOF는 CE에서 유체가 항상 일정한 방향으로 움직이게 하는 중요한 힘이다. Fused silica capillary의 벽은 표면 silanol group이 이온화되어 수용액 중에서 음전하를 띠고 있다. 그러므로 silica 표면과 용액사이의 계면에서는 bulk용액에서와는 달리 양전하를 띤 전해질이 모여서 움직이지 않는 이중 층을 만든다. 이러한 양전하를 띤 성질이 움직일 수 있는 확산 층까지 계속된다. 여기에 silica 표면과 평행하게 전장을 걸어주면 표면 주변에 더 많은 이온들은 음극으로 이동하고 이 때 이온들이 solvate되어 용매를 끌고 이동하게 된다. 이 EOF는 silica와 용액의 계면에 있는 확산 층에서 일어나므로 용액 중의 전해질의 농도와 pH 등에 의하여 변하게 된다. 수용액이 압력 차이에 따라 모세관을 통과할 때 유체의 앞쪽은 포물선 모양을 이룬다. 이는 유체의 속도가 관의 벽에서 거의 0인 반면 벽에서 멀어짐에 따라 속도가 거리의 제곱에 비례하므로 나타나는 현상이다. 반면 EOF의 속도 거동은 거의 평범한 모양을 보인다. 이는 전하 불균형이 용액의 계면에서 일어나기 때문이다. 이런 EOF의 plug flow는 hydrostatic flow보다 band broadening이 적다. 또한 이 flow는 시료를 분리할 때 스스로 생겨서 flow를 한 방향으로 흐르게 하는 약한 펌프로써 작용하게 된다.

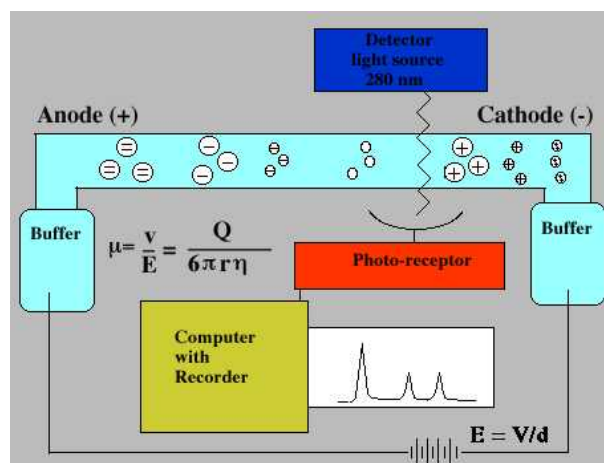


Fig. 1. Schematic Description of Capillary Electrophoresis System

일반적으로 CE에서는 주로 내경이 25 μm ~ 75 μm 정도로 매우 작은 buffer solution 만으로 채워진 capillary를 사용한다. Capillary를 사용하면 많은 장점이 있는데, 특히 전기장에 의해 발생하는 열의 영향을 감소시킬 수 있다. capillary의 전기저항이 높기 때문에 최소한의 열을 발생시키면서 높은 전기장(100 ~ 500V/cm)을 걸어줄 수 있고, 표면적 대 부피의 비가 크기 때문에 발생하는 열을 효과적으로 발산시킬 수 있다. 또한 높은 전기장을 걸어주게 되면 결과적으로 분석 시간이 짧아지고 효율과 분리도도 높아지게 된다. capillary 내에서 용액의 전체적인 흐름을 일으키는 EOF에 의해 이론단수 10⁵ 이상의 높은 효율을 얻을 수 있다. 이러한 EOF는 전하에 관계없이 모든 용질을 동시에 분석할 수 있다. 또한 CE는 다양한 분리 모드를 이용하여 선택성을 조절할 수 있고 적은 양의 시료(1 ~ 10 nl)소모, capillary 직접 검출(On-capillary Detection), 정량 분석 및 자동화의 가능성으로 인하여 급속도로 발전하고 있는 분리 기술이다[6].

EOF의 또 다른 장점은 전하에 관계없이 모든 성분이 같은 방향으로 이동한다는 것이다. 정상 조건 하에서(즉, 캐필러리의 표면이 음으로 하전된 상태) 흐름은 양극에서 음극으로 향한다. 음이온도 음극으로 흐르게 되는데 이는 EOF의 크기가 음이온의 전기영동적 이동도보다 월등히 크기 때문이다. 이렇게 모두 같은 방향으로 이동하므로 양이온, 중성 물질, 음이온이 모두 한꺼번에 분리될 수 있다. 양이온인 경우 가장 빠른 속도로 이동하는데 이는 양이온의 전기적 이동방향과 EOF의 방향이 동일하기 때문이다. 중성 물질인 경우는 전기적 이동에 의해서가 아니라 모두 EOF와 함께 용리되기 때문에 각각의 성분이 서로 분리되지 않는다. 음이온은 EOF의 반대방향인 양극으로 끌리므로 가장 느린 속도로 이동하지만 결국에는 월등히 큰 EOF에 의해서 음극으로 향하게 된다 [6].

(2) 레이저 유발형광 검출법

레이저 유발형광(laser-induced fluorescence)은 말 그대로 분자가 형광을 발생시키도록 하기 위해 레이저를 이용한다는 것인데 각 분자의 고유한 양자 에너지의 준위의 간격과 일치하는 파장을 갖는 빛이 존재할 경우, 분자는 그 빛을 흡수하여 에너지적으로 들뜬 상태가 되고 이 때 다시 들뜬 상태에서 바닥상태로 전이하게 될 때 빛을 내놓게 되는데 이를 형광이라고 한다. 이 검출법은 감도와 선택성이 높기 때문에 복잡한 생체 혼합물 내에 극미량으로 존재하는 생화학물을 분석하는 데에 매우 유용하다. 시료의 양이 줄어들수록 potentiometric detection 이나 굴절을 변화를 이용한 검출법이 유리하기도 하지만, 검출한계가 더 낮은 분석법이 개발되면 분석화학, 생물학 및 의학분야에서 여태까지 할 수 없었던 많은 연구가 가능하게 되므로 레이저 유발형광의 검출한계를 낮추려는 연구가 꾸준히 수행되고 있다[7].

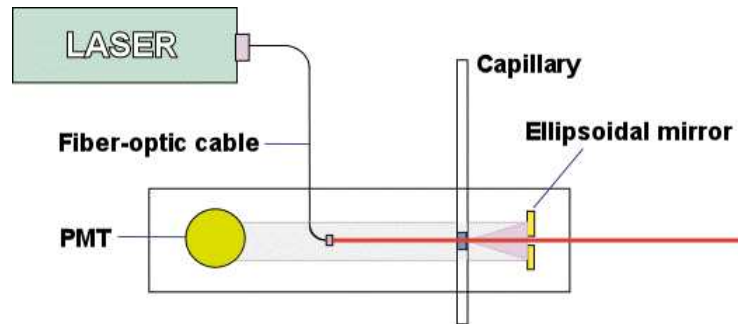


Fig. 2. Schematic Principle of Laser-Induced Fluorescence Detection System [8]

분자가 공명전이 파장의 레이저빔을 지나는 동안, 검체의 형광수명은 수 나노초로서 빔을 통과하는 시간에 비하면 훨씬 짧기 때문에 여기와 형광방출 과정을 계속 되풀이하여 폭발적인 형광방출을 일으키게 된다. 그러나 용액 중의 단일 분자에서 나오는 형광은 모든 방향에 대해 같은 확률로 방출되기 때문에 실제로 검출장치로 모을 수 있는 빛은 전체의 약 10~20%이다. 그리고 여기에 필터의 투과율(50% 정도)과 검출기의 양자효율(10~50%)을 고려하면 전체적인 광검출 효율은 0.5~5%밖에 되지 않는다[6].

이렇게 작은 신호를 검출하려면 잡음을 최대한으로 줄여야 한다. 용액 중의 분자를 검출할 때 생기는 주요 잡음에는 용매 분자의 광산란, 그리고 불순물에서 발생하는 형광이 있다. 이러한 바탕신호는 검출부피가 커질수록 세어지므로 검출부피를 최소화하는 것이 단일 분자 검출에서 매우 중요하다[6].

References

1. K.K. Jain, *Tibtech*, 2000, **18**, 278.
2. H. Becker and C. Gartner, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 12.
3. V. Neuhoff, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 3.
4. www.i-stat.com
5. M.A. Schwarz and P.C. Hauser, *Lab on a Chip*, 2001, **1**, 3.
6. 노경원, 임관섭, 한중훈, *화학세계*, 1998, **38**, 34.
7. J.-G. Moller, H. Stass, R. Heining, and G. Blaschke, *Journal of Chromatography B*, 1998, **716**, 325
8. bachem.snu.ac.kr/research/CE/cesystem.html