



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학박사 학위논문

나노입자 기반의 단백질 검출을
위한 나노슬릿 미세유체칩의 개발

Nanoslit membrane integrated microfluidic
system for nanoparticle based protein detection

2015 년 2월

서울대학교 대학원

전기 컴퓨터 공학부

고 율

나노입자 기반의 단백질 검출을 위한 나노슬릿 미세유체칩의 개발

Nanoslit membrane integrated microfluidic
system for nanoparticle based protein detection

지도 교수 김 용 권

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함
2015 년 2월

서울대학교 대학원
전기 컴퓨터 공학부
고 율

고율의 공학박사 학위논문을 인준함
2015 년 2월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초 록

본 논문에서는 Lab-on-a-chip에서 사용되는 나노입자를 포획하기 위한 나노구조물이 집적화된 나노슬릿 칩을 개발하였다. 이를 이용하여서 마이크로비드 어세이에 의해 마이크로비드의 표면에 결합된 형광나노입자를 분리하여 나노슬릿 칩에서 포획 및 농축하는 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 개발함으로써, 기존의 마이크로비드 어세이보다 고민감도의 검출이 가능하도록 하였다. 이를 위해 MEMS공정을 이용한 나노슬릿 제작 방법을 개발하였고, 형광나노입자를 분리 및 포획하는 실험을 통해서 제작된 나노슬릿 칩의 성능을 평가하였다. 또한 제작된 나노슬릿 칩에서 나노입자의 크기에 따른 분리 및 포획 기능을 이용하여서 목표 단백질의 농도에 따라 나노입자 복합체가 생성되는 응집반응을 검출할 수 있는 플랫폼으로도 사용하였다. 최종적으로는 마이크로비드 어세이를 위한 미세유체 칩과 나노슬릿 칩을 연계하는 시스템을 구현하였다. 개발한 시스템의 검증을 위해 펩타이드-스트렙타비딘 어세이를 통해 스트렙타비딘이 코팅된 형광 나노입자를 검출하는 실험을 진행하였다. 실험 결과, 마이크로비드 어세이에서는 형광신호가 매우 약하게 나오는 저농도의 샘플의 경우에도, 나노슬릿 칩 기반의 검출에서 검출하며는 나노입자의 농축으로 인해서 형광신호가 증폭되어 민감하게 검출되는 효과를 확인할 수 있었다. 이로 인해 마이크로비드 어세이에서는 잘 보이지 않는 $10^6/\text{ml}$ 의 저농도 형광나노입자 샘플인 경우에도 나노슬릿 칩 기반 검출에서는 정량적인 형광신호가 나오는 것을 확인하였다. 이러한 실험결과를 통해 본 연구에서 제안하는 나노슬릿 칩을 이용한 나노입자의 포획 및 농축이

기존의 마이크로비드 어세이의 검출의 한계를 50배 이상 향상시킬 수 있음을 보였다.

본 연구에서 제안하는 나노슬릿 칩은 나노슬릿 박막과 실리콘 하부 유체채널, 그리고 PDMS 상부 유체채널로 구성되어 있다. 나노입자를 포함한 시료들은 PDMS 상부 유체채널을 통해 주입되고, 나노슬릿 박막을 통과하면서 포획되도록 하였다. 또한 본 연구에 사용될 나노슬릿 칩은 액체시료 속에 존재하는 저농도의 나노입자를 포획할 수 있어야 하므로 많은 양의 유체를 흘릴 수 있는 높은 체적흐름을 가지는 소자의 설계가 필요하다. 이를 위해서 나노유체소자의 유체저항을 고려한 설계를 진행하였다. 나노슬릿의 개수가 소자 전체의 체적흐름에 미치는 영향을 수치적인 해석과 FEM시뮬레이션을 통해서 분석하였고, 이러한 분석을 토대로 약 3800개 이상의 나노슬릿을 가지는 유체소자를 설계하여 제작을 진행하였다. 나노슬릿의 제작방법은 일반적인 MEMS공정 방법인 사진공정, 건식식각, 습식식각 등의 공정을 통해서 먼저 마이크로 크기의 슬릿을 만들고, 산화막을 증착하는 방식으로 크기를 줄이는 공정을 시도하였다. 이를 통해 최소 300 nm 크기의 나노슬릿을 제작할 수 있었다. 또한, 300 nm 이하의 선폭을 가지는 나노슬릿을 제작하기 위하여 기존의 사진식각 공정보다 더 작은 선폭이 구현가능한 스텝퍼 (stepper) 공정을 이용한 나노슬릿 제작 공정도 진행하였다. 스텝퍼 장비를 이용한 나노슬릿 제작은 실리콘 질화막에 나노슬릿을 500 ~ 600 nm 선폭으로 만든 후, Cr/Au를 나노슬릿에 증착하여 선폭을 줄이는 방식으로 공정을 진행하였고, 최소 250 nm의 나노슬릿을 만들 수 있음을 확인하였다.

이렇게 제작된 나노슬릿 칩의 나노입자 포획 성능을 평가하기 위하여 유체실험을 진행하였다. 먼저 나노슬릿 칩의 유체저항이 설계된 값에 잘 부합하는지 확인하기 위한 체적흐름측정 실험을 진행하였다.

제작된 나노슬릿 칩은 50 kPa의 인가 압력에 약 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 체적흐름을 나타내었으며 이는 Lab-on-a-chip에서 사용되기에 충분히 빠른 체적흐름이다. 다음으로 800 nm 선폭의 나노슬릿 칩에서 450 nm의 청색 형광입자와 1.8 μm 의 적색 형광입자를 크기에 따라 분리하여 포획하는 실험을 진행하였다. 다양한 농도의 미세입자 용액 샘플을 준비한 후, 나노슬릿 칩에 주입하고 형광측정을 통해 형광나노입자들이 나노슬릿에 포획되었는지를 확인하였다. 실험 결과, $10^5/\text{ml}$ 이하의 농도에서 마이크로입자와 나노입자가 크기 별로 잘 분리되는 것을 확인하였다. 마지막으로 나노슬릿 칩의 크기에 따른 나노입자의 분리 포획 기능을 이용하여 단백질 응집반응을 검출하는 플랫폼으로 나노슬릿 칩을 사용하였다. 실험 결과, 목표단백질인 biotinylated bovine serum albumin (b-BSA)의 농도에 따라 나노슬릿 칩에 걸리는 형광나노입자 복합체들이 증가하는 것을 확인 할 수 있었고, 이때의 목표단백질 검출한계는 10 pM이었다.

본 연구의 최종목표는 마이크로비드 어세이 칩과 나노슬릿 칩을 연계하여 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 구현하는 것이다. 이를 위해 PDMS와 슬라이드 유리를 이용하여 30 μm 크기의 마이크로비드를 포획할 수 있는 어세이 칩을 개발하고, 이를 나노슬릿 칩에 연계하여 미세유체시스템을 구현하였다. 이렇게 개발된 미세유체시스템의 성능을 평가하기 위해서 펩타이드-스트렙타비딘 반응을 이용한 모델링 실험을 진행하였다. 실험에는 스트렙타비딘과 친화적으로 결합할 수 있는 펩타이드 서열 LHPQF이 합성된 30 μm 크기의 마이크로비드와 스트렙타비딘이 코팅된 450 nm의 형광나노입자를 이용하였다. 조건 실험들을 통해 형광나노입자가 펩타이드-스트렙타비딘 반응을 통해 마이크로비드에 결합하고 다시 화학적, 물리적인 방법을 통해 분리될 수 있도록 실험조건을 확립하였으며, 각 단계마다 마이크로비드의 형광을

측정하여 형광나노입자의 결합 및 분리 정도를 확인하였다. 마지막으로 저농도의 형광나노입자를 나노슬릿 칩 기반 검출시스템에서 검출하는 실험을 진행하였다. 실험결과 마이크로비드 어세이 칩에서의 형광신호에 비해서 나노슬릿 칩 기반 검출의 경우, 형광신호가 훨씬 증폭되는 것을 확인할 수 있었고, 이는 형광나노입자의 검출한계를 $10^6/\text{ml}$ 로 50배 이상 향상시키는 결과이다. 마지막으로 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템의 실제적인 응용으로, 스트렙타비딘 단백질에 대한 펩타이드 서열 후보군의 친화력 검사에 실험을 수행하였다. 3종류의 펩타이드 서열 LHPQF, FHPQG, IHPQG에 대한 스트렙타비딘 단백질의 친화도를 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 통해서 매우 정확하게 정량화할 수 있었다.

본 논문에서 개발된 나노슬릿 칩 기반 검출시스템은 다양한 단백질 검출 방법에 효과적으로 적용될 수 있다. 특히 마이크로비드 기반의 단백질 검출에 있어서 비드의 표면에 분포되어 있는 나노입자를 분리하여 나노슬릿 칩에 농축하는 것은 저농도의 단백질을 검출하는데 기여할 수 있을 것이다. 또한, 나노슬릿 칩은 나노입자가 사용되는 여러 분야에서 나노입자의 양을 정량적으로 검출하는 소자로서 폭넓게 사용될 것으로 기대된다.

주요어 : 바이오멤스, 나노유체소자, 나노입자 포획, 나노채널, 마이크로비드 어세이

학 번 : 2010-30207

목차

목차.....	v
제 1 장 서론	1
1.1 연구의 배경.....	1
1.2 논문의 동기.....	11
1.3 논문의 목적.....	13
1.4 논문의 구성.....	14
제 2 장 나노슬릿 칩의 구조 및 설계	16
2.1 서론 16	
2.2 나노슬릿 칩의 구조.....	17
2.3 나노슬릿 칩의 설계.....	18
2.3.1 나노슬릿 박막의 설계 및 유체저항 계산.....	18
2.3.2 나노슬릿 박막의 유체저항 시뮬레이션	22
2.4 요약 및 검토.....	26
제 3 장 나노슬릿 칩의 제작	27
3.1 서론 27	
3.2 나노슬릿 박막 및 하부 유체 채널의 제작.....	28
3.2.1 사진공정을 통한 나노슬릿 유체 채널의 제작.....	28
3.2.2 스텝퍼공정을 통한 나노슬릿 유체 채널의 제작	33
3.3 나노슬릿 칩의 상부 유체 채널의 제작.....	36
3.4 제작된 나노슬릿 칩의 정렬 및 패키징.....	38
3.5 요약 및 검토.....	40
제 4 장 나노슬릿 칩을 이용한 미세 입자 분리	41
4.1 서론 41	

4.2 나노슬릿 칩의 유체 흐름 측정 실험	42
4.2.1 나노슬릿 칩의 체적 흐름 측정 시스템 구성.....	42
4.2.2 나노슬릿 칩의 체적 흐름 측정 결과	44
4.3 나노슬릿 칩을 이용한 미세 입자 분리 및 검출	47
4.3.1 미세입자 분리 및 검출 과정	47
4.3.2 미세입자 크기 및 농도에 따른 검출 결과.....	48
4.4 나노슬릿 칩의 단백질 응집 반응 검출에의 응용.....	60
4.5 요약 및 검토.....	63
제 5 장 마이크로 비드 어세이를 위한 나노슬릿 칩	
기반의 검출 시스템	65
5.1 서론	65
5.2 Test tube 어세이 및 기초 실험.....	67
5.3 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템을 이용한 펩타이드-스트렙타비딘	
어세이	79
5.3.1 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템의 구성	79
5.3.3 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템을 이용한 펩타이드 -	
스트렙타비딘 어세이 결과.....	86
5.4 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 이용한 펩타이드 서열의	
스트렙타비딘 단백질 친화력 검사.....	99
5.5 요약 및 검토.....	104
제 6 장 결 론	106
참고 문헌.....	109
Abstract	118

그림 목차

그림 1-1. Lab-on-a-chip에서 목표단백질을 농축하는 예.....	3
그림 1-2. 광학 검출 기반 마이크로비드 어세이의 장단점.....	5
그림 1-3. 수평구조의 나노유체소자.....	7
그림 1-4. 수직구조의 나노유체소자 (AAO공정).....	8
그림 1-5. 수직구조의 나노홀 유체채널 (E-beam 공정).....	9
그림 2-1. 나노슬릿 칩의 개념도.....	17
그림 2-2. 나노슬릿 칩의 유체저항 모델링.....	19
그림 2-3. 나노슬릿 칩의 압력에 따른 체적흐름.....	21
그림 2-4. 시뮬레이션을 위해 작성된 나노슬릿 칩의 구조.....	23
그림 2-5. 나노슬릿 칩의 압력구배 시뮬레이션 결과.....	24
그림 2-6. 나노슬릿의 개수에 따른 유체 속도 시뮬레이션 결과.....	25
그림 3-1. 나노 슬릿 칩의 제작 공정.....	30
그림 3-2. 나노 슬릿 칩의 제작 결과.....	31
그림 3-3. 나노 슬릿 박막의 단면 측정.....	31
그림 3-4. 나노슬릿 선폭 변화 측정(산화막 증착).....	32
그림 3-5. 나노슬릿 선폭 변화 그래프.....	32
그림 3-6. 나노슬릿 칩 제작 공정 (스텝퍼 공정 이용).....	34
그림 3-7. Cr/Au 증착에 따른 나노슬릿 선폭의 변화 측정: (a) SEM이미지	

(b) 선폭 측정 결과.....	35
그림 3-8. 아크릴 구조물의 (a) 개념도와 (b) 사진.....	39
그림 4-1. 나노슬릿 칩의 유체 흐름 측정 시스템.....	43
그림 4-2. 나노슬릿 칩의 체적흐름 측정 결과.....	45
그림 4-3. 나노슬릿 칩의 선폭 측정 결과.....	46
그림 4-4. 나노슬릿 칩의 미세입자 분리 및 검출 과정.....	47
그림 4-5. 마이크로 입자 포획 실험: (a) 1.8 μm 의 미세입자를 주입한 결과 (b) 형광 신호 그래프.....	50
그림 4-6. 나노입자 여과 실험: (a) 800 nm 나노슬릿 칩에 450 nm 나노입자를 주입한 결과 (b) 형광 신호 그래프.....	51
그림 4-7. 나노홀 칩과 나노슬릿 칩에서 나노입자의 농도별 여과실험..	52
그림 4-8. 나노입자와 마이크로입자 분리/포획 실험: 2종류의 미세입자 (1.8 μm , 450 nm) 분리 실험 결과.....	54
그림 4-9. 미세입자의 개수에 따른 형광 신호의 크기 (1개, 2개, 3개)....	58
그림 4-10. 포획된 미세입자의 개수와 형광신호의 비교.....	59
그림 4-11. 나노슬릿 칩을 이용한 응집반응검사 검출실험의 개념도.....	60
그림 4-12. 나노슬릿 칩에서 biotinylated BSA 단백질의 검출결과.....	62
그림 5-1. 펩타이드 - 스트렙타비딘 어세이의 기초 실험.....	67
그림 5-2. 형광이미지 프로세스 과정.....	69
그림 5-3. Test tube 펩타이드 - 스트렙타비딘 어세이 결과.....	70

그림 5-4. Test tube 실험의 결과 그래프: (a) 어세이 실험 (b) 대조군 실험.....	71
그림 5-5. Test tube 어세이의 나노슬릿 칩 기반 검출.....	73
그림 5-6. 마이크로비드에서 형광나노입자를 분리하는 조건실험.....	74
그림 5-7. Test tube 실험의 나노슬릿 칩 기반 검출 결과.....	76
그림 5-8. Test tube 실험의 나노슬릿 칩 기반 검출의 결과 그래프: (a) 어세이 실험 (b) 대조군 실험.....	77
그림 5-9. Test tube 어세이의 마이크로비드와 나노슬릿 칩 기반 검출의 형광신호 비교.....	78
그림 5-10. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 개념도.....	80
그림 5-11. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 구성.....	82
그림 5-12. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 실험 과정.....	85
그림 5-13. 펩타이드-스트렙타비딘 어세이 과정 (형광이미지).....	88
그림 5-14. 마이크로비드 어세이칩의 실험 결과.....	91
그림 5-15. 마이크로비드 어세이 칩의 결과 그래프: (a)어세이 실험 (b)대조군 실험.....	92
그림 5-16. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 실험 결과.....	94
그림 5-17. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 결과 그래프: (a)어세이 실험 (b)대조군 실험.....	95
그림 5-18. 마이크로비드 어세이 칩과 나노슬릿 칩의 어세이 결과 비교.....	98
그림 5-19. 마이크로비드 어세이 칩에서의 친화력 검사 실험 결과.....	101

그림 5-20. 마이크로비드 어세이 칩에서의 친화력 검사 결과 그래프..	101
그림 5-21. 나노슬릿 칩에서의 친화력 검사 실험 결과.....	103
그림 5-22. 나노슬릿 칩에서의 친화력 검사 실험 결과 그래프.....	103

표 목차

표 2-1. 나노슬릿 칩의 유체 저항 계산값.....	15
표 3-1. PDMS 주형제작을 위한 SU-8 사진공정의 조건	29
표 4-1. 마이크로 입자와 나노 입자 분리 결과	55

제 1 장 서 론

1.1 연구의 배경

반도체 공정 기술의 발달은 수십 마이크로 이하의 작은 크기의 구조물들을 실리콘, 유리, 그 밖의 다양한 물질을 이용하여 제작하는 기술들의 발전으로 연결되었고, 이는 전기적인 반도체 소자뿐 아니라 다양한 방면에서 사용이 될 수 있는 소자의 개발로도 이어졌다. 특히 생명공학의 발전과 반도체 공정 기술이 융합되어서 기존의 실험실에서 수행하던 실험을 손바닥보다 작은 크기의 마이크로 유체 채널 내에서 수행하는 Lab-on-a-chip은 새로운 연구 분야로 발전되어 왔다. Lab-on-a-chip은 기존 실험실에서 수행하던 생화학 물질들의 반응, 분리, 검출 등의 작업을 수백 마이크로 이하 크기의 유체 채널에서 수행하는 것을 목적으로 하므로 채널 내의 유체와 내용물을 제어하는 것이 핵심 기술이라고 할 수 있다. 이를 위해서 다양한 펌프, 밸브, 및 유체 제어를 위한 마이크로 구조물 등이 연구되고 있다 [1-3].

Lab-on-a-chip이 다루는 생화학 물질은 대표적으로 DNA, 단백질, 세포로 나눌 수 있다. 이중 단백질은 인간의 몸 속에서 일어나는 생명 현상과 질병의 발병 및 원인에 밀접한 관계가 있어 주된 연구의 대상이 되어왔다. 하지만 크기가 수십 나노미터 이하인 단백질을 분리 및 검출하는 것은 쉽지 않은 일이다. 따라서 최근에는 단백질의 분리 및 검출에 관한 다양한 Lab-on-a-chip 연구가 발표되고 있다 [4-12].

마이크로 비드 기반 어세이

사람의 혈액과 같은 액체시료에서 목표 단백질을 분석하기 위해서는 목표 단백질을 농축하는 과정이 선행되는 것이 바람직하다. 목표 단백질은 주로 질병과 관련된 것으로서 항원-항체 반응을 통해서 검출한다. 이를 위해서 마이크로 유체 채널에 항체를 고정화하여 단백질을 농축하기도 하지만 [13-17], 최근에는 마이크로비드의 표면에 항체를 고정하고, 이 입자들을 마이크로 유체 채널에 충전하여 단백질을 농축하는 방법이 있다 [18-25]. 마이크로비드를 이용한 방법은 비드의 삼차원 충전 구조 사이사이로 액체가 흘러 들어가기 때문에 확산계수(diffusion coefficient)가 높아 반응이 빠르고, 항체가 코팅된 표면 대 부피의 비율이 매우 높은 환경을 만들어 낮은 농도의 단백질도 민감하게 검출이 가능하다는 장점이 있다. 또한 기존의 실리콘이나, 유리와 같은 유체 채널의 벽면에 항체를 코팅하는 것보다 간편하고 대량으로 준비가 가능한 장점도 있어 Lab-on-a-chip의 많은 플랫폼에 사용되고 있다.

질량 분석 기반의 단백질 검출 방법

이렇게 분리 농축된 단백질을 검출하는 방법은 크게 질량분석(mass spectroscopy (MS))을 통한 직접적인 검출과 형광과 같은 광학적 신호를 이용한 간접적인 검출로 나눌 수 있다. 그림1-1는 미세유체 칩에서 목표 단백질을 Solid-Phase Extraction (SPE)하여 농축하는 칩의 하나로 Carcinoembryonic antigen (CEA)을 유체채널에 포획된 마이크로 비드의 표면에 농축한 후, 유체채널에 집적화된

마이크로 히터를 통해 칩의 온도를 상승시켜서 농축된 CEA 단백질을 용출하고, 최종적으로는 Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization과 같은 대형질량분석 장치에 넣어서 분석을 한다. 이러한 질량 분석을 기반으로 하는 단백질 검출은 목표 단백질을 직접적으로 분석하는 방식이므로 단백질 검출의 신뢰도가 매우 높다고 할 수 있다. 하지만, 목표 단백질을 농축하는 과정 후에도 추가적으로 단백질을 트립신 (trypsin)을 이용하여 좀 더 작은 크기의 펩타이드로 쪼개는 과정과 MALDI-TOF MS 분석을 위한 전처리 과정이 필요하여 시간이 많이 소요된다는 문제점이 있다 [18, 26-28].

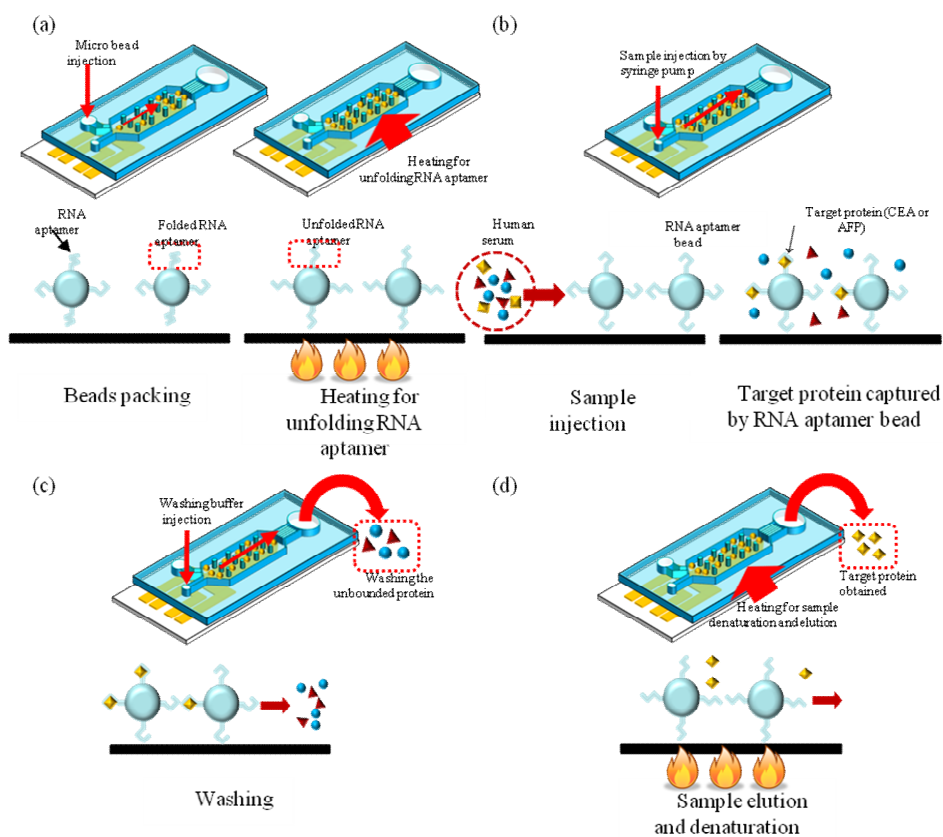
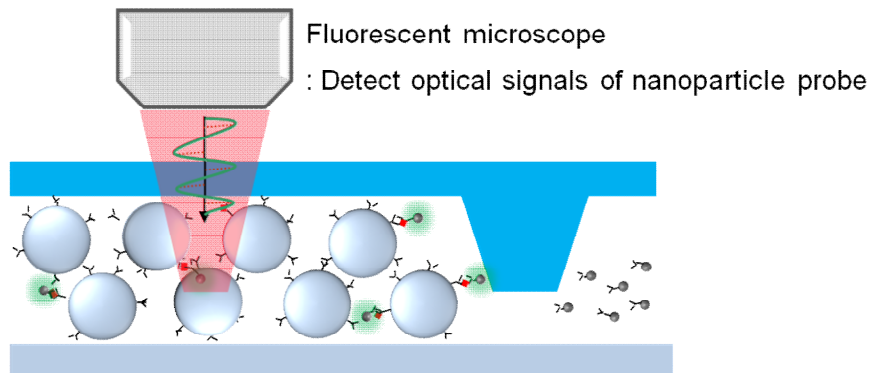


그림 1-1. Lab-on-a-chip에서 목표단백질을 농축하는 예.

광학 신호 기반의 단백질 검출 방법

단순히 생체시료 내에 검출하고자 하는 단백질의 존재 유무와 농도에 대한 분석이 실험의 목적인 질병 진단의 경우에는, 프로브 물질을 이용하여서 단백질이 농축된 정도에 따라 발생하는 광학적 신호를 통해 단백질의 양을 추정할 수 있다. 목표 단백질이 존재하면, 나노입자 표면에 고정된 항체와 마이크로비드의 표면에 고정된 항체들이 목표 단백질을 매개로 sandwich 형태로 결합하게 되고, 이때 마이크로비드의 표면에 고정된 나노입자에서 발생하는 형광신호를 통해 단백질의 양을 추정할 수 있다 [29-33]. 사용되는 나노입자는 주로 수집에서 수백 나노미터 크기의 금속 또는 폴리머 입자로 광학적인 검출을 위해서 형광신호나 라만 산란 신호를 발생할 수 있도록 제작된다. 대표적인 나노 입자로는 금나노 입자, 형광 나노입자, 양자점 등이 있으며 이들이 발생시키는 광학 신호를 통해 시료 내에 타겟 단백질의 양을 추정할 수 있다. 하지만, 마이크로비드 및 다른 물질들에서 발생하는 형광 신호가 나노입자의 신호 민감도를 저하시킬 수 있으며, 3차원으로 충전된 마이크로비드의 표면에 나노 입자가 결합된 상태에서 측정하기 때문에, 나노입자에서 발생하는 신호가 비드들에 의해서 가려지거나 왜곡될 문제가 있다. 그림1-2는 마이크로 비드 기반 단백질 농축에서 형광을 기반으로 검출하는 경우의 장점과 단점을 나타낸 것이다.



→ Microbead column hinder the optical detection.

• **Advantage of Microbeads based assay**

- Large surface area
- 3-D structure (short diffusion length)

• **Disadvantage of Microbeads based assay**

- Large detection area
- 3-D structure hinder the optical detection

그림 1-2. 광학 검출 기반 마이크로비드 어세이의 장단점.

따라서 마이크로비드 어세이에 사용되는 나노입자를 제어하는 것은 단백질 검출의 민감도를 향상시킬 수 있다. 최근 나노 입자를 제어하기 위한 소자로서, 수백 나노미터 이하의 구조물, 유체 채널, 또는 구멍들을(nanopore array) 마이크로 유체 시스템 내부에 집적화하는 나노유체 소자들이(nanofluidic device) 주목을 받고 있다 [34, 35]. 이러한 소자들은 나노구조물 또는 나노채널에 나노입자나 나노크기의 생화학물질들만 농축함으로써 분석의 민감도를 향상시키거나 마이크로입자로부터 나노입자를 분리하는 역할을 수행할 수 있다. 나노유체 소자들은 구조에 따라 크게 수평구조의 소자와 수직구조의 소자로 나뉠 수 있다.

수평 구조의 나노유체소자

수평구조의 나노유체소자는 나노채널이 기판의 방향과 평행한 것으로, 채널의 높이나 폭이 수십에서 수백 나노미터이고 채널의 길이는 마이크로미터 이상의 크기를 가진다. 그림 1-3은 수평구조 나노유체소자의 예로써 유리 기판을 40 nm 식각하여 나노채널을 제작한 후 마이크로 채널을 제작한 것이다. 하지만 얇고 긴 채널구조는 나노입자의 포획 및 분리의 측면에서 볼 때 적합하지 않다. 이러한 유체 채널은 유체 저항을 급격하게 증가시키므로 채널을 통해 많은 양의 유체를 흘리는 것이 불가능하다. 또한 채널의 총단면적이 수 μm^2 이하로 매우 낮아 나노입자들이 크기에 따라 분리 및 포획 되는 것이 아니고, 크기와 상관없이 나노채널의 앞쪽에서 막힐 가능성이 매우 높다. 나노유체소자의 제작공정 측면에서 보면, 수평구조의 나노유체 소자를 제작하기 위해서는 전자빔 리소그래피(electron beam lithography), focused ion milling, nano-imprint 등의 고해상도 패터닝 공정이 주로

사용되며 제작 비용이 비싸다는 단점이 있다 [36-41]. 최근에는 제작 비용과 시간을 줄이기 위한 방안으로써 폴리머 기반의 다양한 나노채널 공정들이 연구되고 있다 [42, 43].

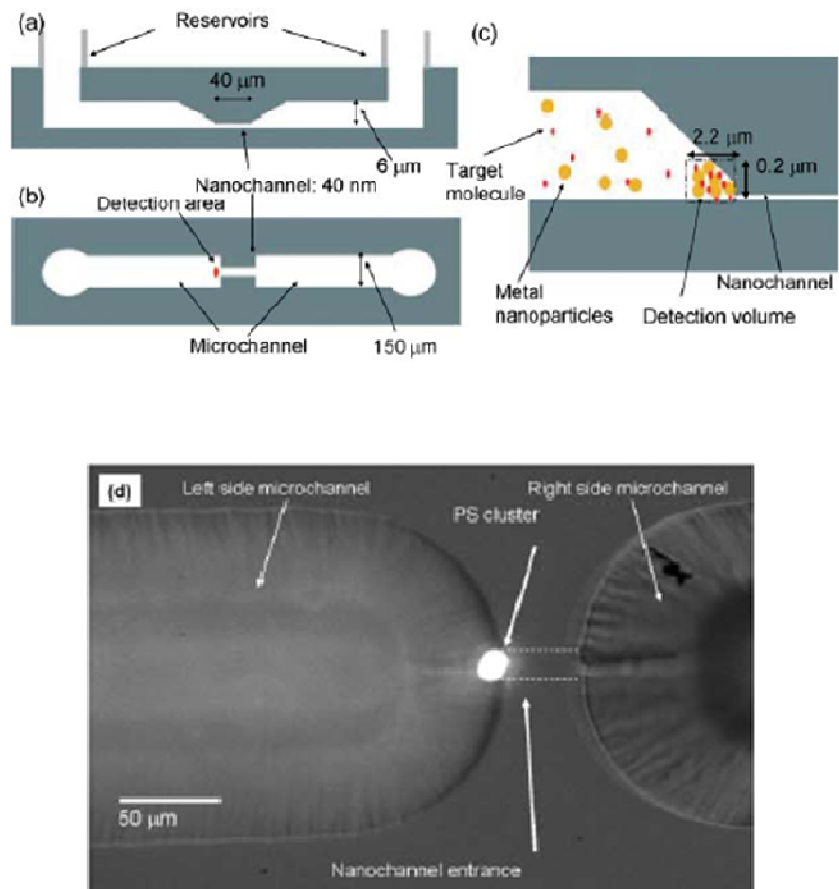


그림 1-3. 수평구조의 나노유체소자.

수직 구조의 나노유체소자

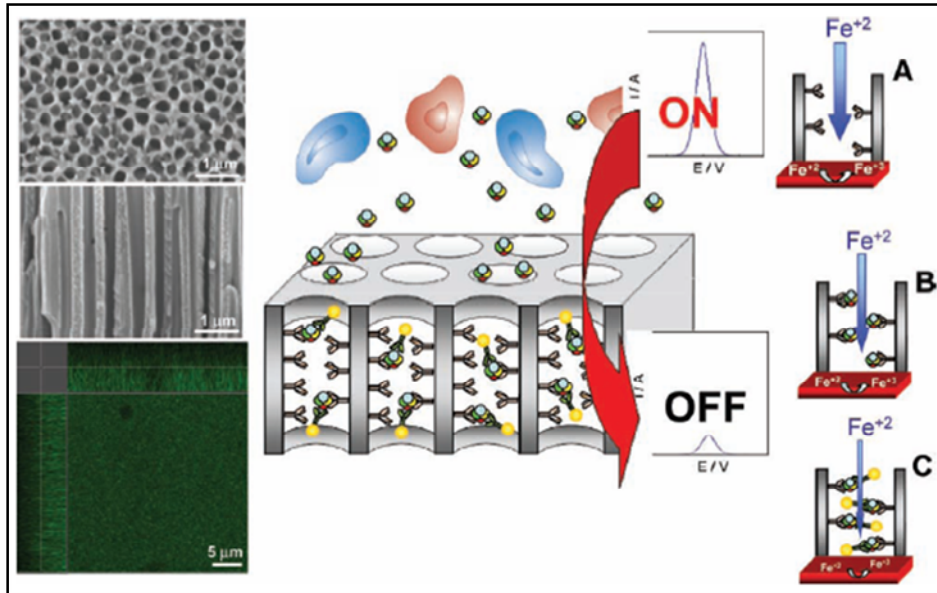


그림 1-4. 수직구조의 나노유체소자 (AAO공정).

수직구조의 나노유체소자의 경우에는 나노채널의 방향이 기판을 관통하는 형태를 가지고 있다. 주로 실리콘 질화막이나 실리콘 산화막을 관통하는 방식으로 채널을 제작하며, focused ion milling와 같은 top-down 방식의 제작 방법도 사용되지만, nanosphere lithography (NSL)나 anodic aluminum oxidation (AAO) 같은 bottom-up 방식의 제작 방법이 많이 사용되고 있다 [44-46]. 나노입자 분리 및 포획의 측면에서 보면, 수직구조의 나노유체소자는 수평구조의 소자보다 적합하다. 수직구조의 소자의 경우, 박막을 관통하는 방식으로 나노유체 채널을 제작하기 때문에 다수의 나노채널을 2차원 배열형태로 제작할 수 있기 때문이다. 이는 전체 유체 저항을 감소시킬 뿐만 아니라 나노입자가 나노채널에 비특이적으로 포획되는 현상 또한 완화시킬 수 있다. 그림 1-4는 AAO를 이용하여 만든 수직 구조의

나노유체소자이다. 200 nm이하의 수직 유체 채널을 AAO 공정으로 제작하고, AAO의 벽면에 단백질을 붙여 전기화학적 방식으로 단백질을 검출하는 플랫폼을 개발한 것이다. NSL이나 AAO 같은 bottom-up 방식의 나노채널은 비교적 간단하고 저렴하게 나노채널을 제작할 수 있다는 장점이 있지만, 제작되는 나노채널의 모양이 제한적이고, 크기 또한 균일하지 않은 문제가 있다. 또한 아직까지 많은 bottom-up 방식들이 wafer level의 대면적 대량 생산에 적합하지 않는 것도 큰 단점이라고 할 수 있다.

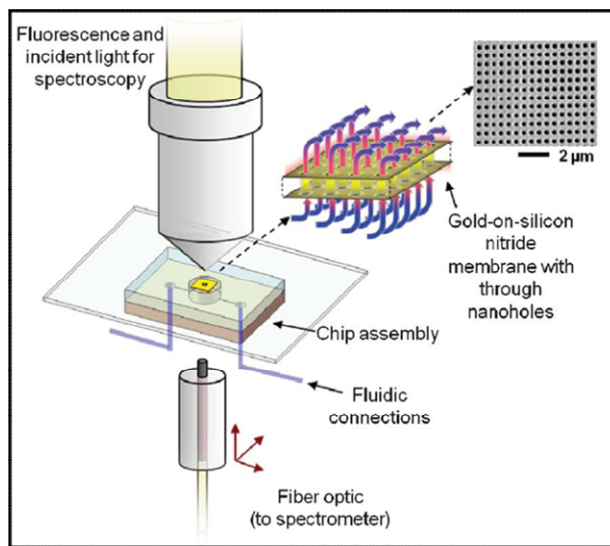


그림 1-5. 수직구조의 나노홀 유체채널 (E-beam 공정).

그림1-5는 전자빔 리소그래피공정 (EBL)을 이용하여서 만든 수직구조의 나노홀 유체소자이다. EBL이나, FIB같은 top-down공정인 경우 작게는 수십 나노미터 크기의 나노채널을 정교하게 제작할 수 있지만, 제작 단가가 비싸고 공정에 소요가 되는 시간도 길다 [47, 48].

따라서 나노입자를 분리하고 포획하는 나노유체소자를 개발하는 것에 있어서, 아래와 같은 조건들이 충족되는 것이 바람직할 것이다.

첫째로 수직구조의 나노유체채널이 2차원 배열의 형태로 다수 제작되는 것이 바람직하다. 이는 칩의 전체 유체저항을 낮추고, 나노입자들이 나노유체 채널을 통해서 크기에 따라 선택적으로 분리가 될 수 있게 해준다. 다음으로 top-down제작 방식이나 bottom-up제작 방식의 단점들을 보완하는 제작공정이 필요하다. 따라서 wafer level의 제작공정이 가능하면서, EBL이나 FIB milling과 같은 고가의 공정을 사용하지 않는 제작공정을 개발할 필요가 있다. 마지막으로 포획된 나노입자를 정량적으로 검출할 수 있는 구조를 가진 나노유체소자를 고안할 필요가 있다 [49].

1.2 논문의 동기

Lab-on-a-chip에서 마이크로비드를 이용한 어세이는 높은 민감도를 보여주고 있으며, 질병의 진단 및 예방을 위한 플랫폼으로 큰 가능성을 가지고 있다. 하지만, 마이크로비드의 3차원 구조로 인해 단백질 검출 시 발생하는 광학적 신호의 감소 및 왜곡 현상은 개선해야 할 필요성이 있다. 본 연구는 이를 개선하기 위해서 단백질 검출에 의해서 마이크로비드의 표면에 고정된 나노입자들만을 분리하여 포획하는 나노유체소자를 개발하고, 이를 기존의 마이크로비드 어세이 칩과 연계하는 시스템을 개발하고자 하였다. 이는 마이크로비드 어세이의 민감도를 향상시키는 방법에 좋은 방안이 될 수 있다.

마이크로 크기의 입자를 포획하는 연구들은 많이 보고되어 왔으나 나노입자를 포획하는 기술에 대해서는 연구가 많이 진행되지 않았다. 나노입자를 포획 방법은 기본적으로 마이크로 크기의 입자를 포획하는 방법과 같이 기둥이나 댐과 같은 구조물을 이용하면 된다. 하지만 나노 크기의 구조물들을 균일하게 제작하는 방법이 아직 잘 확립되어 있지 못하며, 대량으로 소자를 제작하는 방법 면에서도 한계가 있다. 현재 나노 구조물을 만드는 두 가지 방식인 Top-down과 bottom-up 방식은 모두 장점과 단점을 가지고 있다. Top-down 방식은 수십 나노미터의 선폭까지 정교하게 제작이 가능하지만, 공정가격이 비싸고 오랜 시간이 걸리는 단점이 있다. Bottom-up 방식의 제작은 상대적으로 비용이 저렴하고 간편하게 제작이 가능하지만, 선폭의 크기 및 균일도에 한계가 있으며, 모양 또한 자유롭지 않다. 또한 두 가지 방식 모두 wafel level의 대량생산이 필요한 Lab-on-a-chip의 제작 방식에는 적합하지 않다. 따라서 나노유체소자를 고가의 제작 공정을 사용하지

않고, wafer level의 대면적으로 제작할 수 있는 공정 방법을 개발한다면 이는 효과적인 Lab-on-a-chip 플랫폼으로 사용될 수 있을 것이다.

1.3 논문의 목적

본 논문의 목적은 첫째, 수백 나노미터 크기를 가지는 나노 구조물을 MEMS 공정을 이용하여 제작하고, 미세유체채널에 집적화된 형태로 구현하는 것이다. 구체적으로는 나노슬릿 패턴이 다수 존재하는 박막을 MEMS 공정을 통해서 제작하고, 마이크로 유체 채널과 나노슬릿 패턴의 박막이 연결되도록 한다. 마이크로 유체 채널을 통해 유체가 주입되고 박막의 나노슬릿 패턴을 통과하면서, 나노입자들이 나노슬릿에 포획되는 형태의 나노슬릿 칩을 개발하도록 한다.

다음으로는, 제작된 나노슬릿 칩을 마이크로입자와 나노입자를 포획 및 분리하는 실험에 활용하는 것이다. 제작된 소자가 마이크로입자와 나노입자를 크기에 따라 포획 및 분리할 수 있는지 검증하기 위해, 다양한 크기의 미세입자 분리 및 포획실험을 수행한다. 또한 나노입자의 크기에 따른 분리 및 포획 기능을 이용하여, 목표 단백질의 존재 유무와 농도에 따라 나노입자가 응집하는 응집 반응(agglutination assay)을 나노슬릿 칩에서 검출하는 연구를 수행한다.

최종적으로는, 마이크로비드 어세이를 위한 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 개발하여 펩타이드-스트렙타비딘 어세이를 수행한다. 스트렙타비딘 단백질이 코팅된 형광나노입자와 펩타이드가 합성된 마이크로비드로 어세이를 진행하고, 어세이의 결과를 나노슬릿 칩을 이용하여 검출한다. 이를 통해 나노슬릿 칩 기반의 검출 방식이 마이크로비드 어세이의 검출한계를 향상시킬 수 있는지를 실험적으로 증명한다.

1.4 논문의 구성

본 논문의 2장에서는 본 연구에서 제안하는 나노구조물이 집적화된 나노유체소자인 나노슬릿 칩에 대한 구조와 설계에 대해서 기술하였다. 또한 나노슬릿 칩의 박막 구조가 가지는 장점을 예상하기 위한 이론적인 유체 저항 분석 및 유체 시뮬레이션에 대해서 기술하였다.

3장에서는 나노슬릿 칩의 제작 공정에 대해서 설명을 하였다. 본 연구에서 수행한 두 가지의 제작 공정을 기술하였다. 첫째는 사진식각 공정으로 2 μm 크기의 마이크로 슬릿을 제작한 후에 실리콘 산화막을 증착하여 300 nm의 선폭을 가지는 나노슬릿 칩을 제작하는 것이다. 둘째는 스텝퍼(stepper lithography) 장비를 이용하여 일반적인 사진식각 장비보다 작은 550 nm의 나노슬릿 선폭을 제작한 후, 박막 위에 금속을 증착하여 선폭을 250 nm까지 줄이는 공정이다. 위의 두 가지 제작 공정에 대해 구체적으로 언급하고, 제작 결과에 대해서 기술하였다.

4장에서는 제작된 나노슬릿 칩을 이용하여서 마이크로 입자와 나노 입자를 분리하고 포획하는 실험에 대해서 기술하였다. 또한, 제작된 나노슬릿 칩을 단백질 응집 반응 검사에 활용하는 실험에 대해서 기술하였다.

5장에서는 나노슬릿 칩을 마이크로비드 어세이에 활용하는 방법에 대해서 기술하였다. 먼저, 마이크로비드 어세이를 수행할 수 있는 유체소자와 나노슬릿 칩을 연결한 나노슬릿 칩 기반 검출시스템에 대해서 기술하였다. 다음으로 개발된 시스템의 성능을 검증하는 실험인

펩타이드-스트렙타비딘 검출 실험의 조건과 과정 및 결과에 대해서 기술하였다. 마지막으로 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 이용하여 펩타이드 서열들의 스트렙타비딘 단백질에 대한 친화력을 조사하는 실험에 대해서 기술하였다.

6장에서는 본 논문의 최종적인 검토와 결론을 기술하였다.

제 2 장 나노슬릿 칩의 구조 및 설계

2.1 서론

본 장에서는 나노입자를 포획할 수 있는 나노슬릿 박막의 구조와 나노슬릿 박막과 연결된 PDMS 마이크로채널의 구조 및 설계에 대해서 기술한다.

또한 본 장에서는, 나노입자를 포획하기 위한 나노구조물로서 제안하는 나노슬릿 박막 구조가 가질 수 있는 장점을 유체저항에 대한 이론적인 계산과 유체 흐름 시뮬레이션을 통해서 예상하였다.

2.2 나노슬릿 칩의 구조

그림 2-1은 본 연구에서 제안하는 나노슬릿 칩의 개념도이다. 상부 유체채널(top fluid channel)은 폭 1 mm, 높이 60 μm 의 채널로써 유체 펌프에 의해 주입부(inlet)에 주입되는 액체가 나노슬릿이 있는 박막으로 전달되도록 설계하였다. 그림의 오른쪽에 부분은 실제 제작된 나노슬릿 박막의 전자현미경 이미지이다. 18 μm \times 800 nm 크기의 나노슬릿이 약 3800개가 있어서 낮은 압력에도 유체가 나노슬릿 칩에 잘 흐르도록 설계하였다. 나노슬릿의 개수와 유체저항의 관계에 대해서는 2.3장에서 구체적으로 기술하였다. 마지막으로 주입된 유체가 나노슬릿 박막을 통과하면, 박막의 아래에 동공의 형태로 존재하는 하부유체채널(bottom fluid channel)을 통해 배출구(outlet)로 연결되는 구조이다.

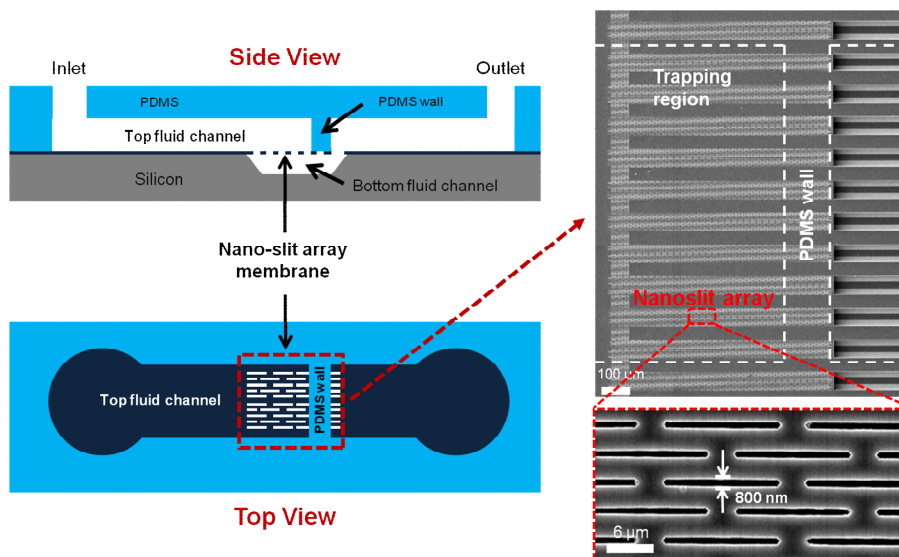
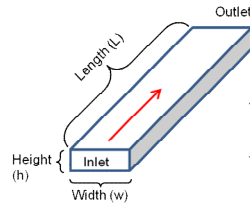


그림 2-1. 나노슬릿 칩의 개념도.

2.3 나노슬릿 칩의 설계

2.3.1 나노슬릿 박막의 설계 및 유체저항 계산

나노입자를 포획하는 나노유체소자를 개발하는데 있어서 유체의 저항은 매우 중요한 고려사항이다. 왜냐하면, 액체시료 속에 존재하는 적은 양의 나노입자를 포획하려면 많은 양의 유체를 나노유체소자에 흘려줘야 하기 때문이다. 식2-1은 유체의 체적흐름(volume flow, Q)과 가해지는 압력(pressure, ΔP)의 관계를 나타낸다 [50]. 유체소자의 체적흐름은 식과 같이 가해지는 압력에 비례하고 유체의 저항(R_{hyd})에 반비례한다. 이때 유체저항은 식2-2와 같이 유체채널의 크기에 의해 결정된다.



$$\Delta P = R_{hyd} \times Q \quad (2-1)$$

$$R_{hyd} = \frac{12 \eta l}{1 - 0.63 (h / w)} \frac{1}{h^3 w} \quad (2-2)$$

높은 체적흐름으로 유체를 흘리기 위해서는 높은 압력을 가하거나, 유체의 저항을 낮추는 두 가지 방안이 있다. 만약 유체에 가해지는 압력을 너무 높이면 유체채널 안의 높은 압력에 의해 칩의 상부와 하부의 결합면이 파괴되어 원하는 방향으로 유체가 흐르지 않을 수 있다. 따라서 유체의 체적흐름을 높이는 방안으로는 유체소자 전체의 유체저항을 줄이는 것이 바람직하다. 그림2-2는 본 연구에서 제안하는 나노슬릿 칩의 유체 저항을 모델링 한 것이다. 주입부에서부터 나노슬릿 박막까지의 유체저항을 R_{inlet} , 나노슬릿 3834개의 유체 저항을 $R_{nanoslit}$.

마지막으로 하부유체채널에서부터 배출구까지의 유체저항을 R_{outlet} 으로 규정하고 수치적인 유체저항을 계산하였다. R_{inlet} 과 R_{outlet} 은 식2-2를 이용하여 구하였고, $R_{nanoslit}$ 은 한 개의 나노슬릿에 대해서 저항을 계산한 후에 나노슬릿의 개수인 3834로 나누었다.

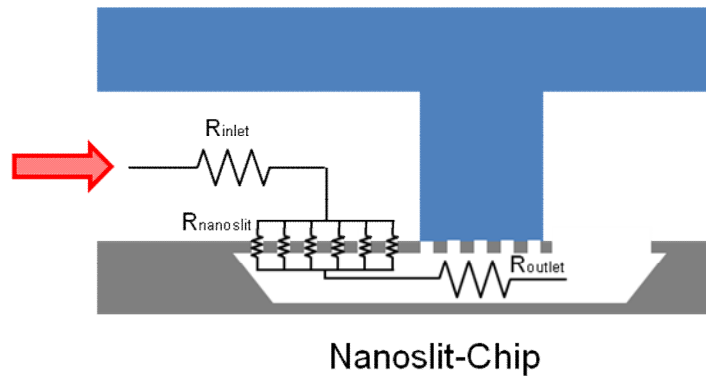


그림 2-2. 나노슬릿 칩의 유체저항 모델링.

표2-1은 나노슬릿 칩의 각 부분에 대한 유체저항을 계산한 결과이다. 표의 결과값에서 보면, $R_{nanoslit}$ 값이 다른 유체 저항요소에 비해 10배 이상 큰 지배적인 유체저항으로 나타난다. 만약 나노슬릿의 개수를 증가시키거나 감소시키면, 소자 전체의 유체저항은 이에 비례하여 변할 것이다. 따라서 다수의 나노슬릿을 제작하여 나노슬릿 칩 전체의 유체저항을 줄이는 것은 나노슬릿 칩의 설계에 있어서 핵심적인 부분이라고 할 수 있다. 그림 2-3는 표2-1의 결과값을 토대로 미세유체시스템에서 일반적으로 사용되는 압력범위에서 (0 kPa ~ 50 kPa) 나노슬릿 칩이 가지는 유체저항을 계산한 것이다. 계산 결과, 유체에 가해지는 압력이 50 kPa일 때 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유체가 흐르게 되며, 이는 일반적인 미세유체소자로서 사용하기에 충분한 체적흐름이다.

표 2-1. 나노슬릿 칩의 유체 저항 계산값.

	W (μm)	H (μm)	L (μm)	N	R_{hyd} ($\text{kg/m}^2\text{s}$)
R_{inlet}	1000	50	7500	1	7.43^{11}
R_{nanoslit}	18	0.4	4	3834	1.10^{13}
R_{outlet}	1000	50	4300	1	4.28^{11}

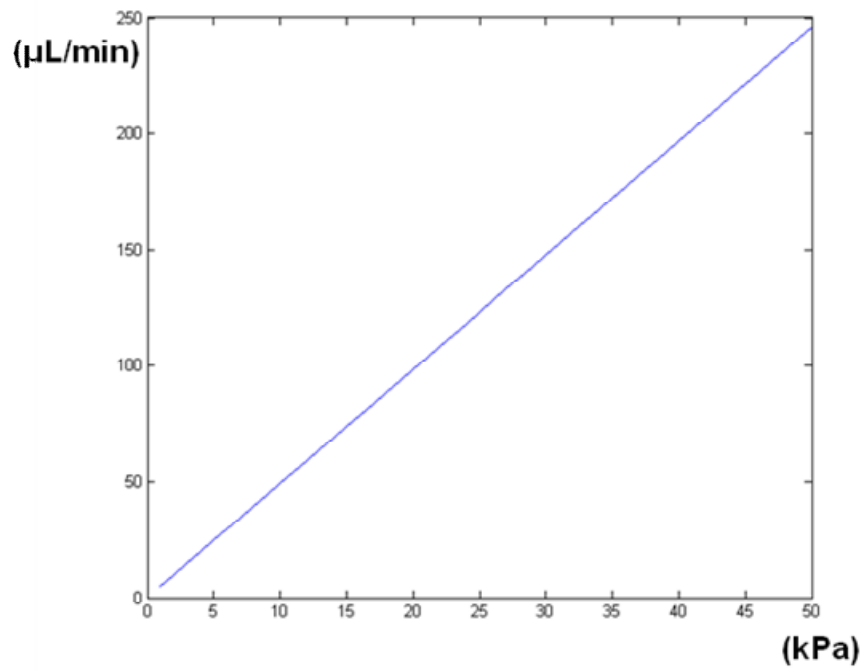


그림 2-3. 나노슬릿 칩의 압력에 따른 체적흐름.

2.3.2 나노슬릿 박막의 유체저항 시뮬레이션

나노슬릿 칩에서 나노슬릿의 개수가 전체 유체저항에 미치는 영향을 예측하기 위해서 유한요소해석법 (Finite element method) 시뮬레이션을 진행하였다. 시뮬레이션 프로그램은 COMSOL microfluidics module을 사용하였다. 그림2-4는 시뮬레이션을 위해 작성된 나노슬릿 칩의 구조이다. 실제 나노슬릿 칩에서는 3800개 이상의 나노슬릿이 존재하지만, 다수의 나노슬릿 구조를 그럴 경우 해석해야 하는 요소(element)들의 수가 너무 많아서 해석이 불가능하게 된다. 시뮬레이션의 목적이 나노슬릿의 개수가 유체저항이 전체 유체저항 얼마나 크게 영향을 미치는지를 확인하는 것이기 때문에 칩의 구조를 단순화하여 2 ~ 10개의 나노슬릿을 가지는 칩을 그리고, 주입부 쪽에 1 kPa의 압력을 주었을 때의 유체의 속도를 확인하도록 하였다.

그림2-5는 1 kPa의 압력이 가해졌을 때 칩안에서의 압력구배 (pressure gradient)를 나타낸 것이다. 나노슬릿의 유체저항이 매우 크기 때문에 대부분의 압력이 나노슬릿 영역에서 감소하는 것을 알 수 있었다. 그림2-6은 나노슬릿의 개수를 2개에서 10개까지 다르게 하였을 경우에 그림2-5의 A-B 단면에서의 유체 속도를 나타낸 것이다. 나노슬릿의 개수에 따라서 A-B 단면의 속도도 비례하여 증가하는 것을 알 수 있으며, 나노슬릿의 영역이 소자 유체저항의 대부분을 차지하는 것을 다시 한번 확인 할 수 있었다. 만약 나노슬릿 이외에 지배적인 유체 저항이 존재한다면, 그림2-6과 같이 유체의 속도가 나노슬릿의 개수에 비례하여 증가하지는 않았을 것이다.

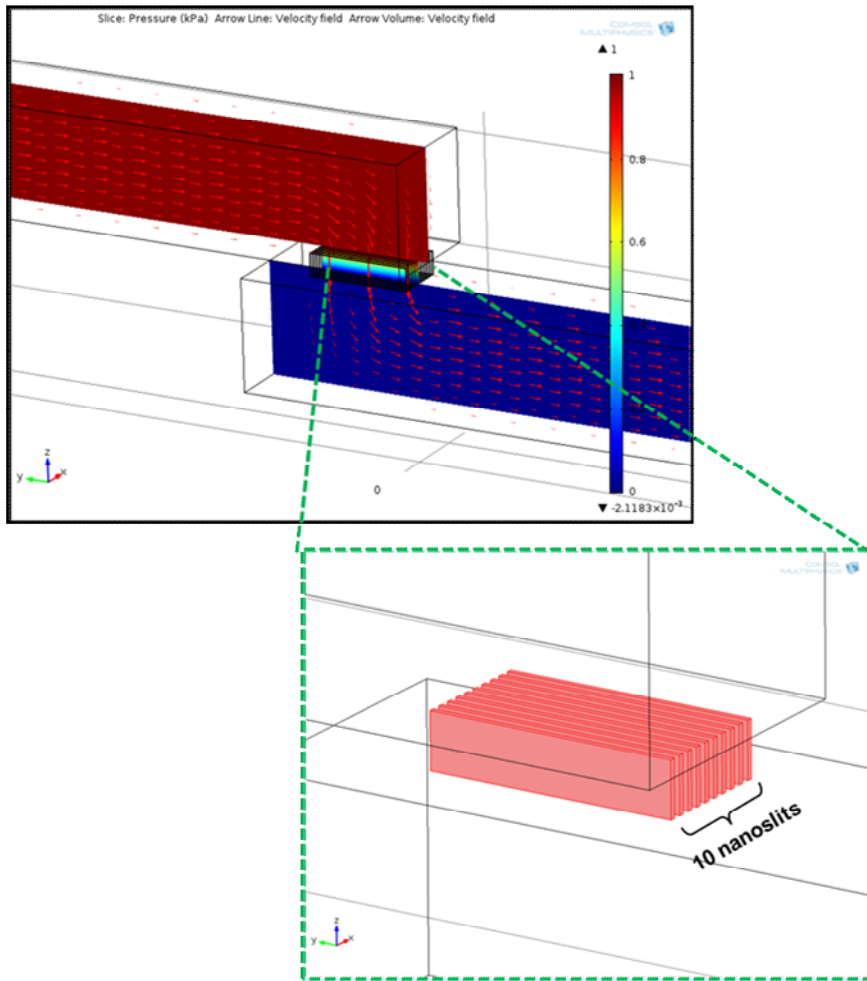


그림 2-4. 시뮬레이션을 위해 작성된 나노슬릿 칩의 구조.

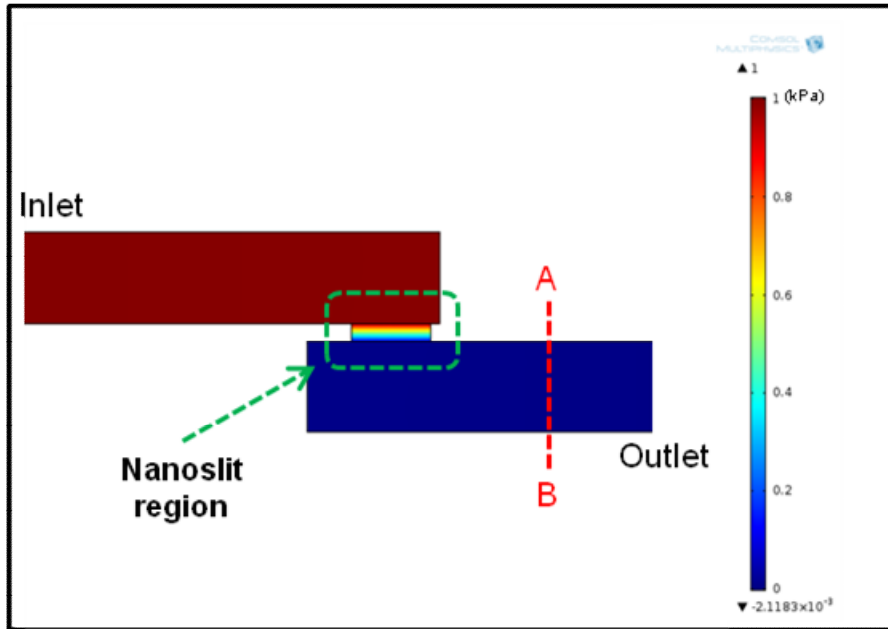


그림 2-5. 나노슬릿 칩의 압력구배 시뮬레이션 결과.

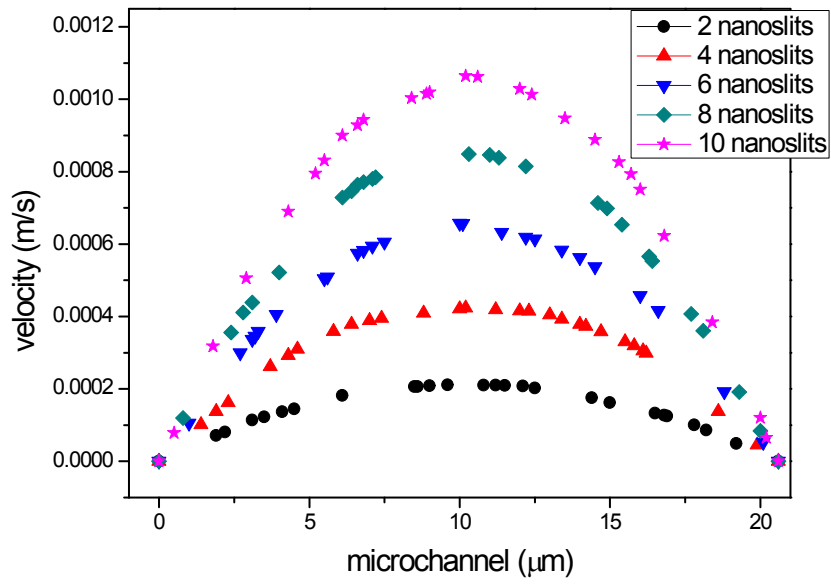


그림 2-6. 나노슬릿의 개수에 따른 유체 속도 시뮬레이션 결과.

2.4 요약 및 검토

본 장에서는 본 연구에서 제안하는 나노입자를 포획하는 소자인 나노슬릿 칩의 구조와 설계에 대해서 기술하였다. 나노슬릿 칩을 설계하는데 있어서 가장 중요한 부분은 칩의 전체 유체저항이며, 많은 양의 유체를 흘릴 수 있는 구조를 고안하여야 한다. 따라서 수평구조의 나노채널 구조가 아닌, 나노슬릿이 수직 방향으로 다수 배열되어 있는 구조를 고안하였고, 3800개 이상의 나노슬릿이 존재하도록 하여 전체유체저항을 낮추었다. 이렇게 설계된 나노슬릿 칩은 수치적인 계산을 통해 50 kPa의 압력에서 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 정도의 체적흐름을 가질 것으로 예상되며, 이는 미세유체시스템에 사용되기에 충분한 체적흐름이다. 또한 COMSOL 유체시뮬레이션을 통해서 나노슬릿의 유체저항이 칩 전체의 유체저항에 대부분을 차지한다는 것을 다시 한번 확인 할 수 있었다. 나노입자를 포획하는 소자를 개발하는데 있어서 전체 유체저항을 반드시 고려해야하며, 전체 유체저항의 대부분을 차지하는 나노채널의 저항을 줄이는 방안으로 다수의 나노유체채널을 병렬로 연결하는 것은 적절한 해결방안이라고 생각된다.

제 3 장 나노슬릿 칩의 제작

3.1 서론

본 장에서는 나노슬릿 칩의 제작 공정 및 결과에 대해서 기술 한다. 나노슬릿 칩의 제작은 나노슬릿 박막이 존재하는 하부 기판 제작과 유체를 나노슬릿 박막으로 흐르도록 유도하는 유체 채널이 있는 상부 기판 제작으로 나뉜다. 각 기판은 MEMS 공정을 이용하여서 독립적으로 제작되며, 최종적으로는 두 기판이 정렬 접합 되어 아크릴 구조물로 고정되게 된다.

본 논문에서 제안하는 나노슬릿 박막의 제작 공정은 나노슬릿의 선포에 따라 크게 두 가지 방법이 있다. 첫 번째 방법은 사진 식각 공정을 이용하여 2 μm 의 마이크로 슬릿을 제작하고, 산화막을 증착시켜서 슬릿의 크기를 줄이는 방법이다. 두 번째 방법은 스텝퍼 공정을 이용하여서 550 nm 정도의 나노슬릿을 제작하고, 금과 같은 금속을 증착하여 250 nm이하의 좀더 작은 나노슬릿을 제작하는 방법이다. 본 장에서는 각각의 나노슬릿 제작 공정 과정에 대해서 기술하고, 두 가지 공정 방법에 따른 제작 결과에 대해서도 기술한다.

또한, 상부 기판으로는 PDMS 유체 채널이 사용되며, PDMS 유체 채널 및 SU-8 주형틀을 제작하는 방법에 대해서도 기술한다.

마지막으로 제작된 PDMS 상부 기판과 나노슬릿 하부 기판을 정렬하여서 아크릴 구조물에 의해서 두 기판을 고정시키는 방법에 대해서 기술한다.

3.2 나노슬릿 박막 및 하부 유체 채널의 제작

3.2.1 사진공정을 통한 나노슬릿 유체 채널의 제작

그림 3-1은 800 nm 선폭의 나노슬릿 칩의 하부 기판을 제작하는 공정의 순서도 이다. 먼저 나노슬릿 박막의 기본 골격이 되는 실리콘 산화막을 1 μm 증착한다. 다음으로 2 μm 선폭의 마이크로 슬릿 패턴들을 사진 식각 공정과 실리콘 산화막 식각 공정을 통하여서 기판 위에 제작한다. 다음으로 마이크로 슬릿 패턴이 실리콘 기판 위에 제작되면, 슬릿 패턴의 아래에 존재하는 실리콘을 제거하여 하부 유체 채널을 제작한다. 이를 위해서 먼저 비등방성 실리콘 식각 공정 (Deep Si etching)을 통해 실리콘을 5 μm 수직 식각하고, TMAH (tetramethyl ammonium hydroxide) 용액에서 비등방성 습식 식각을 수행한다. 습식 식각을 통하여서 마이크로 슬릿 패턴 아래 부분의 실리콘이 제거되며, 최종적으로 V자-형태의 하부 유체채널이 마이크로 슬릿 박막의 바로 아래에 존재하게 된다. 마지막으로 마이크로 슬릿의 선폭을 줄이는 공정을 진행한다. 제작된 마이크로 슬릿 박막 위에 산화막을 화학 기상 증착 (chemical vapor deposition) 방식으로 증착하면, 산화막이 등방성으로 증착되면서 마이크로 슬릿의 선폭이 줄어들게 된다. 이때, 증착량을 조절함으로써 슬릿의 선폭을 목표 선폭으로 크기로 조절 할 수 있다.

그림 3-2는 제작된 300 nm 선폭의 나노슬릿 박막에 대한 SEM 이미지이다. SEM 분석을 통해 실리콘 산화막으로 이루어진 나노슬릿 박막과 하부 유체 채널이 형성된 것을 확인 할 수 있다. 나노슬릿 박막의 단면을 확인하기 위해서 제작된 나노슬릿 칩을 절단하여서

단면을 확인하였다. 나노슬릿 박막의 단면은 그림 3-3와 같이 바닥면은 2 μm 정도의 선폭을 가지며, 실리콘 산화막의 증착으로 인해서 중간부분부터 선폭이 좁아지는 것을 확인할 수 있다. 2 μm 크기의 마이크로 슬릿이 산화막 증착에 의해 나노슬릿으로 제작되는 과정은 그림 3-4에 나타나 있다. 실리콘 산화막을 증착하면 SEM 이미지와 같이 슬릿의 크기가 감소하며, 증착량에 따른 선폭의 감소량은 선형적인 특징을 가진다 (그림 3-5). 하지만 실리콘 산화막의 증착량이 클수록 나노슬릿 박막이 받는 스트레스가 증가하는 문제점이 있으며, 본 연구에서는 최대 25000 Å의 실리콘 산화막 증착을 시도하였으며 이때, 나노슬릿의 선폭은 300 ~ 400 nm였으며 나노슬릿 박막이 산화막 증착에 따른 스트레스에 의해서 조금 휘는 현상을 관찰 할 수 있었다.

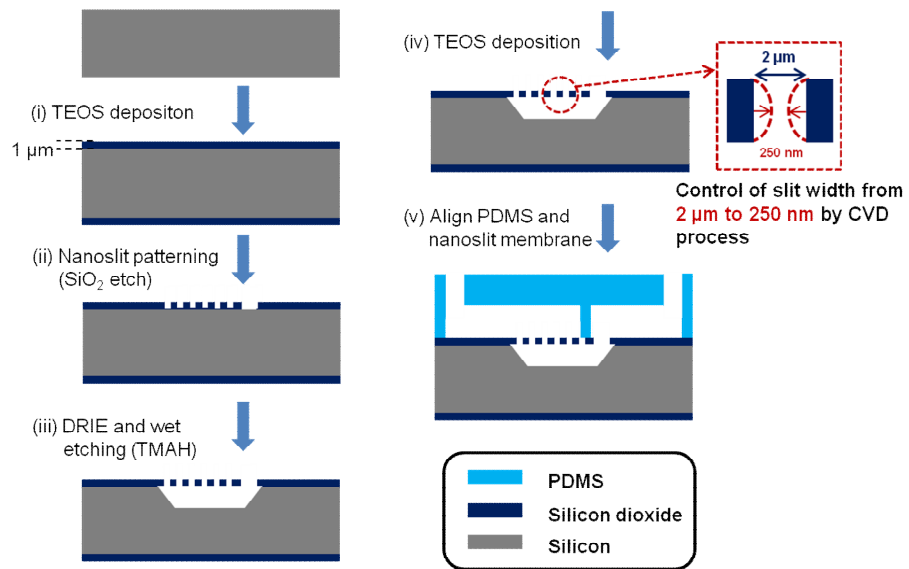


그림 3-1. 나노 슬릿 칩의 제작 공정.

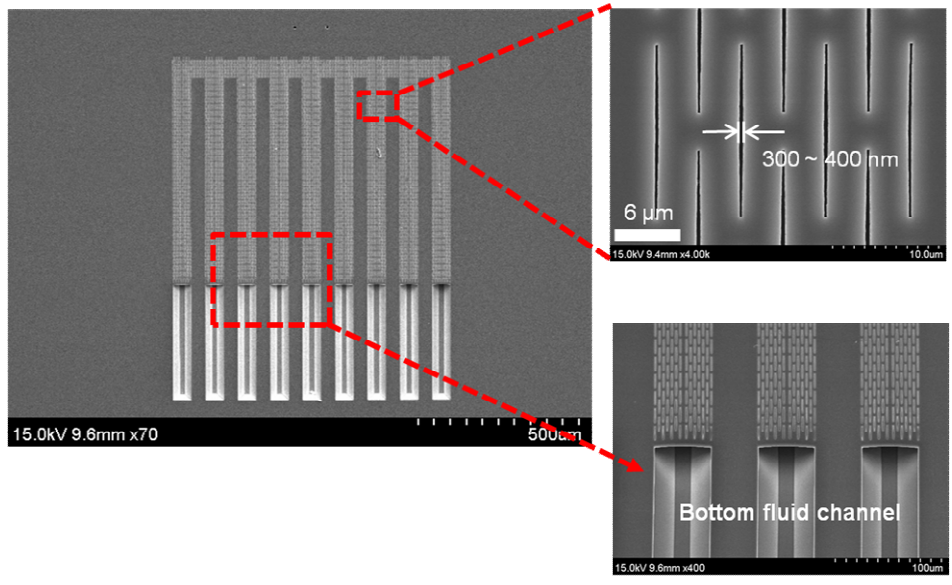


그림 3-2. 나노 슬릿 칩의 제작 결과.

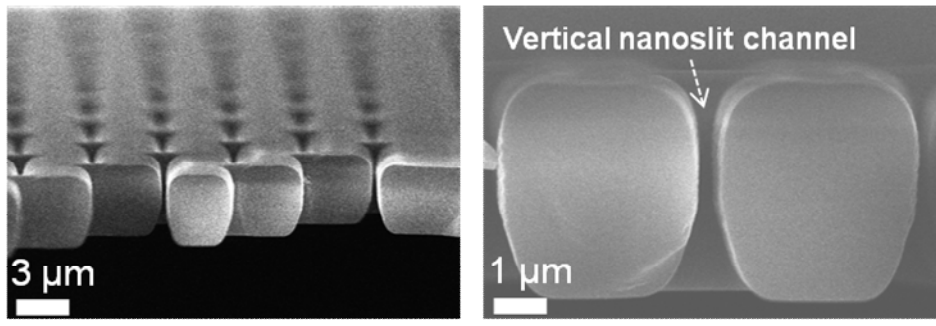


그림 3-3. 나노 슬릿 바닥의 단면 측정.

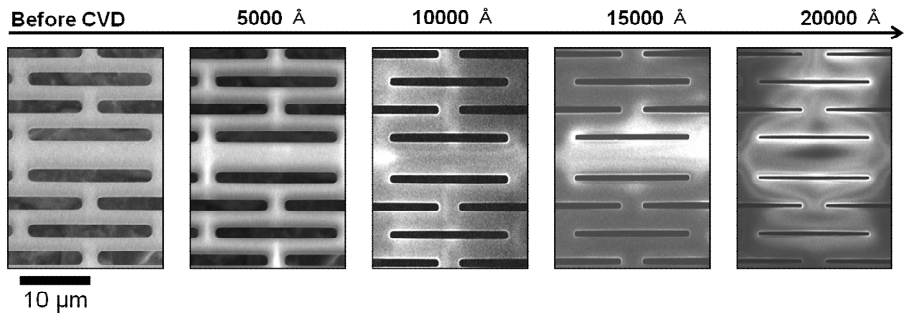


그림 3-4. 나노슬릿 선폭 변화 측정(산화막 증착).

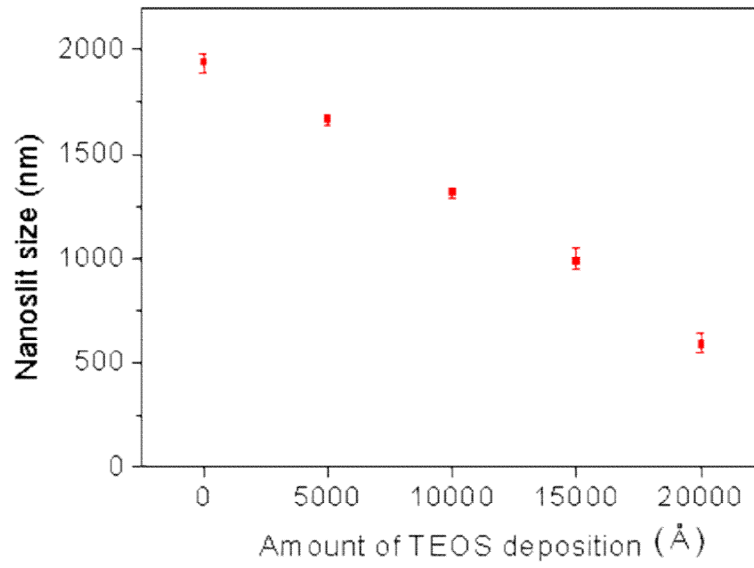


그림 3-5. 나노슬릿 선폭 변화 그래프.

3.2.2 스텝퍼공정을 통한 나노슬릿 유체 채널의 제작

300 nm이하의 나노슬릿을 제작하기 위한 방법으로 스텝퍼공정을 이용하는 방법을 시도하였다. 그림3-6은 스텝퍼 공정을 이용하여 나노슬릿 칩을 제작한 결과이다. 먼저, 500 nm정도의 나노슬릿을 만들고 금속을 증착하여서 250 nm이하의 선폭을 가지는 나노슬릿을 제작하였다. 전체 공정 방법은 3.2.1에서 기술한 방법과 유사하나 스텝퍼공정을 이용하여 500 nm의 나노슬릿에서 슬릿 크기를 줄이는 공정을 시작하는 점과 실리콘 산화막 증착 대신에 Cr/Au를 증착하여 박막이 받는 스트레스를 줄이도록 한 부분이 다르다. 그림 3-7는 Cr/Au를 증착하여서 250 nm이하의 선폭을 가지는 나노슬릿을 제작하는 과정에 대한 전자현미경 이미지이다. 스텝퍼공정과 건식식각을 통해서 550 nm의 나노슬릿이 제작되고, 200/5000 Å의 Cr/Au 증착하여 250 nm이하의 선폭을 가지는 나노슬릿이 제작되는 것을 알 수 있다.

사진공정을 이용한 공정에 비해 스텝퍼공정은 더 작은 선폭의 공정이 가능하지만 공정 단가가 비싸고 픽셀 단위로 기판에 패턴이 전사되기 때문에 소자의 설계에 자유도가 낮아진다는 단점이 있다. 따라서 제작하고자 하는 나노슬릿의 선폭의 크기에 따라 두 가지 공정 방법 중 적절한 것을 선택하는 것이 바람직하다.

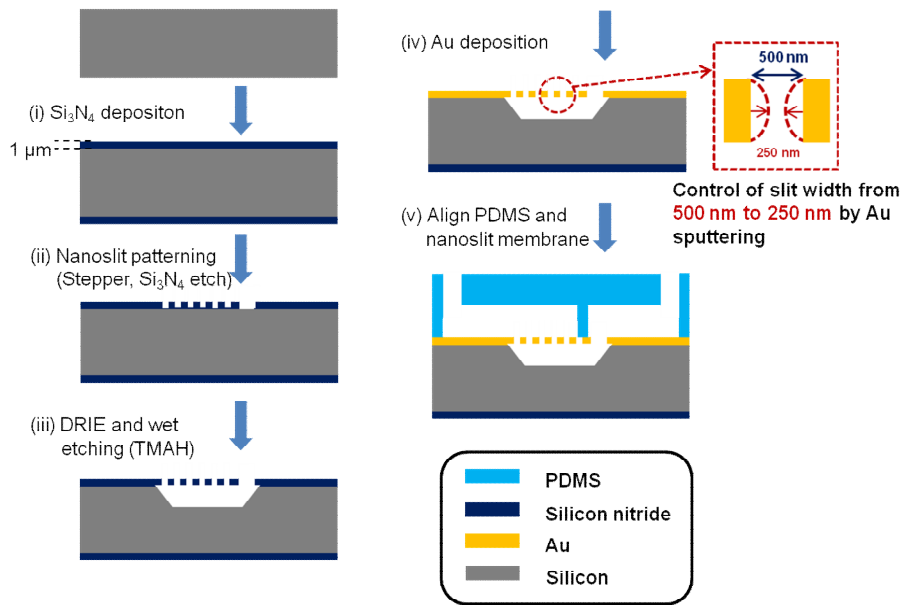


그림 3-6. 나노슬릿 칩 제작 공정 (스텝퍼 공정 이용).

(a)

Cr/Au deposition (nanoslit size control)

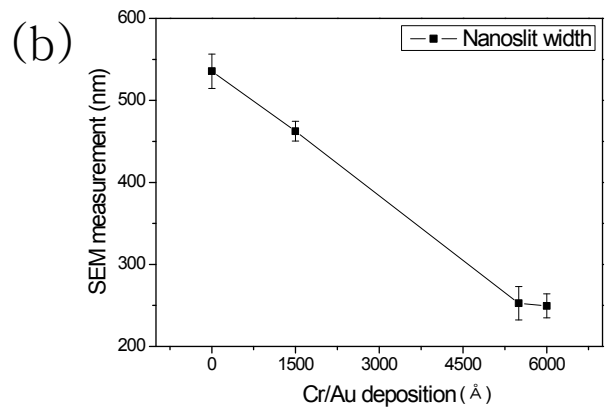
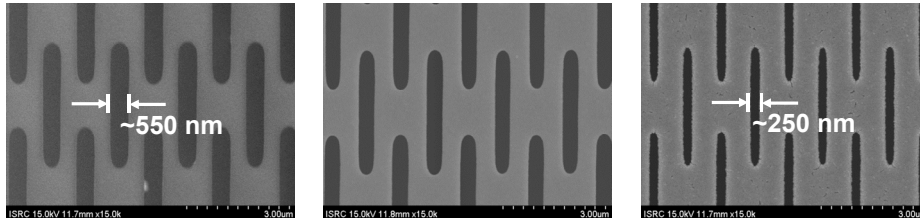


그림 3-7. Cr/Au 증착에 따른 나노슬릿 선포의 변화 측정: (a) SEM이미지 (b) 선포 측정 결과.

3.3 나노슬릿 칩의 상부 유체 채널의 제작

PDMS 상부 유체 채널의 제작 방법은 다음과 같다. PDMS 채널 제작을 위해서는, 먼저 SU-8 감광용액을 이용하여서 주형이 되는 구조물을 제작해야 한다. 제작하고자 하는 유체채널은 폭 1 mm, 높이 60 μm 의 크기를 가져야 하므로, SU-8 2075를 4000 rpm의 속도로 30초간 회전 도포하여서 감광제의 높이가 60 μm 가 되도록 한다. 이후 hot plate에서 soft bake를 위해 65 °C 3분, 95 °C 9분 동안 열처리를 한다. 다음으로 노광 장비 (MA - 6)를 이용하여서 hard contact으로 노광을 215 mJ의 에너지를 웨이퍼에 준다. 노광 후 열처리는 65 °C에서 2분, 95 °C에서 7 분 동안 진행한다. 노광 후의 열처리는 UV에 의해 활성화된 감광제에 에너지를 공급하여 감광제의 polymerization을 초래한다. 마지막으로 웨이퍼를 SU-8 developer에서 8분간 현상 작업을 진행한다. 현상이 끝나면, 이소프로필알콜(IPA)에 3분간 넣어서 SU-8 developer를 제거하고 마지막으로 초순수용액에서 (Deionized water) 세척 한다. PDMS 주형을 제작하기 위한 구체적인 사진식각 공정은 표 3-1에 구체적인 공정 조건을 정리하였다.

다음으로 PDMS 구조물 제작 공정은 다음과 같다. 먼저 PDMS 원액 (sylgard 184A, Dow corning, USA)와 경화제 (sylgard 184B, Dow corning, USA)를 질량비가 10:1이 되도록 섞는다. 잘 섞은 PDMS용액을 제작된 SU - 8 주형에다 부은 후, 진공 챔버에 한 시간 정도 넣어 PDMS가 경화제와 섞이면서 발생한 기포들을 제거한다. PDMS 용액의 기포가 다 제거 되면 70 °C의 오븐에 넣어서 4 시간 동안 열을 가해서 경화시킨다. 이후 주형에서 벗겨내어 아세톤과 IPA로 세척을 한다.

표 3-1. PDMS 주형 제작을 위한 SU - 8 사진 공정 조건.

Spin coating	500 rpm 100 rpm/sec 10 sec 4000 rpm 300 rpm/sec 30 sec
PR stabilization	10 min
Soft bake	65 °C 3 min 95 °C 9 min
Cooling	10 min
Exposure	25 mW 9 sec
Post exposure bake	65 °C 2 min 95 °C 7 min
Cooling	10 min
Develop	SU-8 developer 8 min
Cleaning	IPA 3 min DI 6 min

3.4 제작된 나노슬릿 칩의 정렬 및 패키징

마지막으로 제작된 나노슬릿 하부 기관과 PDMS 유체채널을 정렬하여 나노슬릿 칩을 완성한다. 정렬된 나노슬릿 칩에 유체를 주입할 경우 발생하는 압력에 의해서 상부와 하부 기관의 정렬이 흐트러지거나 접합면이 분리되어 칩에 누수가 발생할 수 있다. 따라서 제작된 두 개의 기관을 단단히 고정시킬 방법이 필요하다. PDMS 플라즈마 접합 방식은 매우 강한 접합력을 가지는 장점이 있지만, 한번 접합된 칩을 분리할 수가 없어서 실험 후에 추가적으로 필요할 수 있는 SEM 측정이 불가능하다. 따라서 본 연구에서는 아크릴 구조물과 자석을 이용하여서 나노슬릿 칩을 고정하는 방식을 이용하였다. 그림 3-8은 본 연구에서 사용한 아크릴 구조물의 개념도와 실제 사진이다. 아크릴 구조물에는 나노슬릿 칩을 로딩하는 부분과 유체튜브와 나노슬릿 칩이 연결될 수 있는 구멍들이 존재한다. 또한 칩의 로딩부분 주위에는 강력한 네오디움자석들이 있어, 자석들의 인력에 의해서 칩이 고정될 수 있도록 하였다.

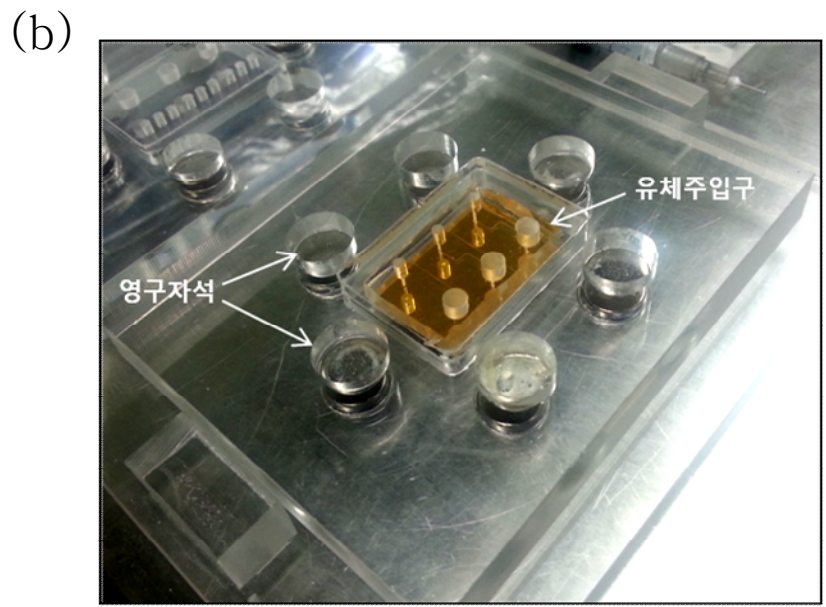
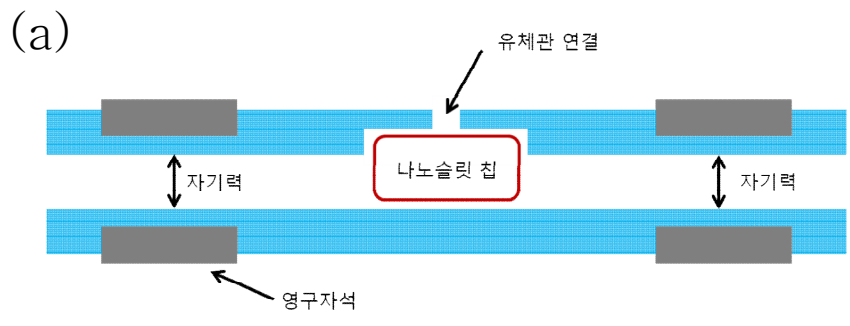


그림 3-8. 아크릴 구조물의 (a) 개념도와 (b) 사진.

3.5 요약 및 검토

본 장에서는 나노슬릿 칩의 제작에 대해서 기술하였다. 먼저, 나노슬릿 박막을 제작하기 위한 공정으로, 사진 식각 공정과 산화막 증착을 통해 슬릿의 선폭을 줄이는 조건을 확립하였다. 슬릿 선폭의 크기는 산화막 증착량에 비례하여 감소하는 것을 확인하였고, 25000 Å의 산화막을 증착한 경우 300 nm ~ 400 nm의 나노슬릿이 제작됨을 확인하였다. 다음으로 300 nm 이하의 작은 선폭을 가지는 나노슬릿 칩을 제작하기 위한 공정으로, 스텝퍼와 Cr/Au 증착을 이용한 공정을 진행하였다. 제작결과, 550 nm 선폭의 나노슬릿에 Cr/Au를 200/5000 Å 증착에 하여서 250 nm이하의 선폭을 가지는 나노슬릿을 제작할 수 있는 것을 확인하였다. PDMS 유체 채널 제작을 위한 공정으로는, 60 μm 높이를 가지는 SU-8 주형 제작 공정을 확립하였고, PDMS soft lithography를 통해서 성공적으로 PDMS 유체 채널을 제작하였다. 마지막으로 PDMS 유체 채널과 나노슬릿 박막이 있는 하부 기판을 정렬하여 고정시키는 아크릴 구조물에 대해 기술하였다. 제작된 아크릴 구조물은 영구자석에 의해 상하부 기판을 고정시킬 수 있으며, 산소 플라즈마 접합과 같은 영구적인 접합 방법이 아니므로 유체실험 후에 PDMS기판을 분리하여 나노슬릿 박막의 상태를 SEM을 통해 확인할 수 있다.

제 4 장 나노슬릿 칩을 이용한 미세 입자 분리

4.1 서론

본 장에서는 첫째로 제작된 나노슬릿 칩의 유체 흐름을 측정하기 위한 실험 구성과 측정 결과에 대해서 기술한다. 제작된 나노슬릿 칩의 체적 흐름 측정값과 나노슬릿의 선폭을 측정한 측정값으로 계산한 유체 저항 및 체적 흐름을 서로 비교하여 기술한다.

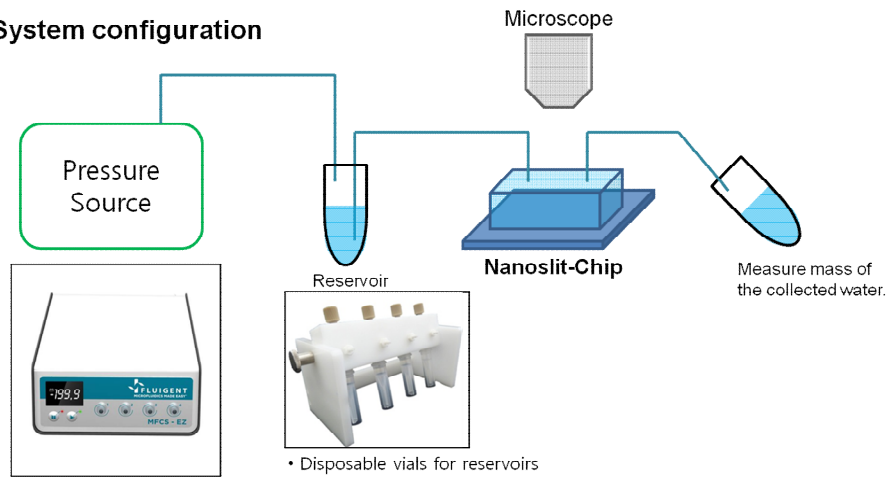
다음으로 서로 다른 크기의 마이크로/나노 입자들을 포함한 용액을 나노슬릿 칩에 주입하여서 나노슬릿보다 큰 크기의 마이크로 입자와 나노슬릿보다 작은 크기를 가지는 나노 입자를 분리하는 실험에 대해서 기술한다. 이를 위해 형광현미경으로 검출이 가능한 형광염료가 포함되어 된 미세 입자를 사용하고, 마이크로/나노 입자들을 분리한 후에 형광현미경으로 나노슬릿 박막을 측정하여 포획된 미세입자의 수를 정량화한 결과들에 대해서도 기술한다. 또한, 형광 측정을 통해서 미세입자를 정량화하는 방법의 신뢰도를 평가하기 위한 분석 결과들도 기술한다

4.2 나노슬릿 칩의 유체 흐름 측정 실험

4.2.1 나노슬릿 칩의 체적 흐름 측정 시스템 구성

나노슬릿 칩의 유체 흐름을 측정하기 위한 시스템은 그림4-1과 같다. 유체의 체적 흐름(volume flow)을 측정하기 위해서는 일정한 압력을 나노슬릿 칩에 가하고, 이때 흐르는 유체의 부피를 측정하여야 한다. 따라서 미세유체 시스템에서 일반적으로 사용되는 실린지 펌프는 일정한 유속을 흘려주는 장비이므로 사용할 수 없다. 본 실험에서는 이를 대신하여서 압력기반 펌프(Fluigent, France)를 사용하였다. 실험에 사용된 압력 기반 펌프는 0 ~ 100 kPa의 압력을 안정적으로 생성할 수 있는 장비로 미세유체시스템 제어에 적합하다. 압력 기반 펌프는 그림4-1과 같이 일회용 용기와 나노슬릿 칩에 연결하여 압력에 따라서 유체가 나노슬릿 칩에 주입될 수 있도록 하였다. 본 실험에는 3차 증류된 한 초순수 (De-ionized water)를 사용하였고, 10 kPa에서 25 kPa의 압력을 나노슬릿 칩에 가한 상태에서 5분 동안 나노슬릿 칩에서 나오는 유체를 일회용 용기에 모아서 질량을 측정하여 체적흐름을 추정하였다.

• System configuration



- Pressure-driven pump (Fluigent, France)
- Pulseless and highly stable pumping (Output pressure range : 0 ~ 100 kPa)
- Labview™ programable device

그림 4-1. 나노슬릿 칩의 유체 흐름 측정 시스템.

4.2.2 나노슬릿 칩의 체적 흐름 측정 결과

그림 4-2은 압력 기반 펌프의 출력압력에 따른 나노슬릿 칩의 체적 흐름 측정 결과이다. 유체에 가해지는 압력에 따라 체적 흐름이 선형적으로 증가하는 것을 확인할 수 있으며, 측정된 체적흐름은 나노슬릿의 선폭이 300 nm에서 450 nm일 때의 이론적인 체적 흐름 값의 범위 내에 존재한다. 그림 4-3은 실험에 사용된 나노슬릿 칩의 선폭을 전자현미경을 통해 측정한 결과이며, 나노슬릿의 선폭이 300 nm에서 500 nm을 가짐을 알 수 있다. 이러한 측정 결과를 토대로 볼 때, 높은 체적흐름을 가지기 위한 나노슬릿 칩의 설계와 제작은 적절했으며, 이론적인 예상 값과도 부합하는 결과라고 생각된다.

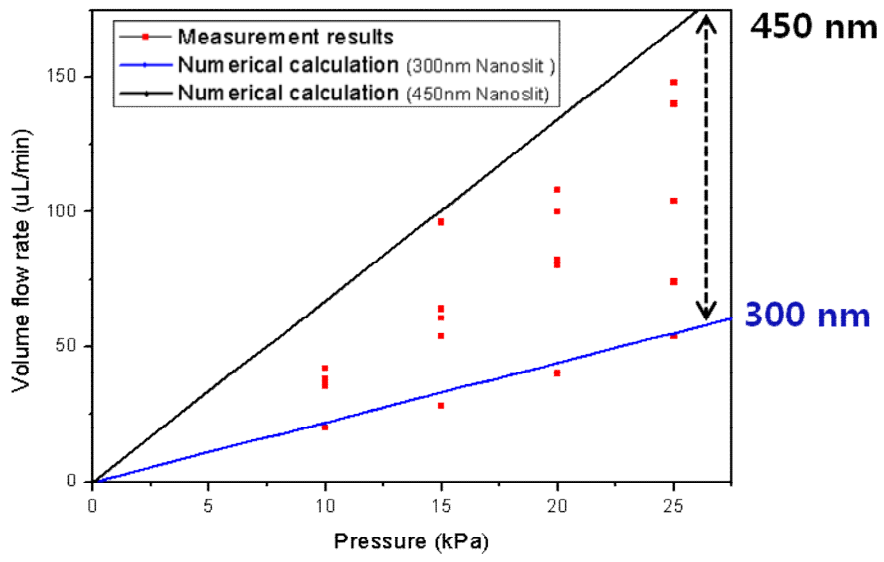


그림 4-2. 나노슬릿 칩의 체적흐름 측정 결과.

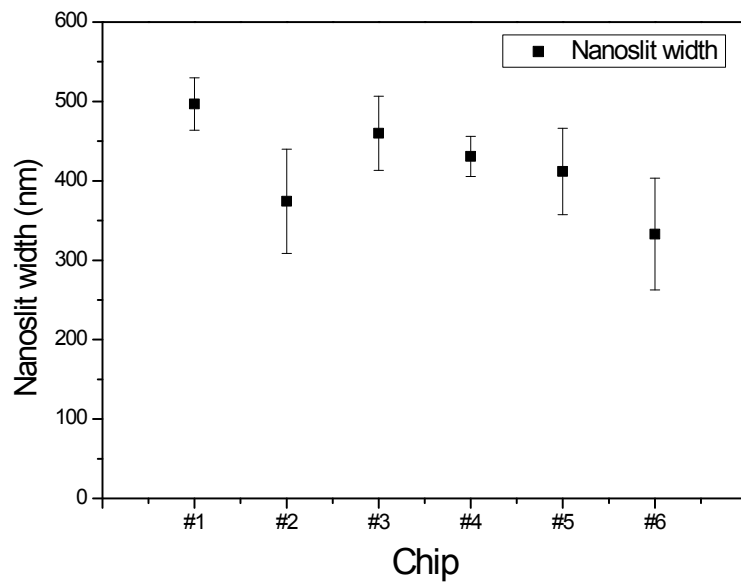


그림 4-3. 나노슬릿 칩의 선폭 측정 결과.

4.3 나노슬릿 칩을 이용한 미세 입자 분리 및 검출

4.3.1 미세입자 분리 및 검출 과정

서로 다른 크기의 미세 입자를 나노슬릿 칩에 주입하여 분리 및 포획하는 실험은 그림 4-4와 같은 순서로 진행하였다. 먼저, 크기가 다른 미세입자들을 농도별로 준비하여 섞은 후 나노슬릿 칩에 주입한다. 이때, 미세입자의 크기가 나노슬릿 박막의 선폭보다 큰 경우 미세입자는 그림 4-4의 (a)와 같이 포획되게 된다. 다음으로 나노슬릿 칩을 건조시키고 PDMS 유체채널을 제거한 뒤에, 형광현미경을 이용하여 포획된 나노입자의 형광신호를 측정한다. 마지막으로 획득한 형광이미지에서 미세입자에 해당하는 영역의 픽셀값을 이미지 분석을 통해 추출하여 포획된 미세입자의 양을 정량화한다.

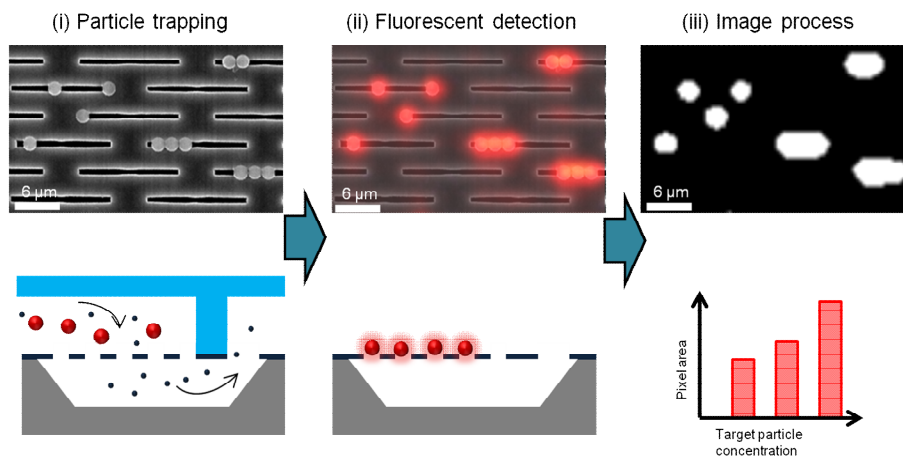


그림 4-4. 나노슬릿 칩의 미세입자 분리 및 검출 과정.

4.3.2 미세입자 크기 및 농도에 따른 검출 결과

그림 4-5는 적색의 형광염료가 포함된 1.8 μm 의 미세입자를 800 nm 선폭의 나노슬릿 칩에 주입한 실험 결과이다. $10^5/\text{mL}$ 농도의 미세입자가 포함된 용액을 주입 후 일정 시간마다 나노슬릿 박막의 형광이미지를 측정하였다. 그림 4-5 (b)는 유체 주입 후 30초, 75초, 150초에 획득한 형광이미지 사진에서 미세입자에 해당하는 적색 형광 신호를 정량화하여서 그래프로 나타낸 것으로 주입 시간에 따라 적색 형광 신호가 비례하여 증가하는 것을 알 수 있다.

다음으로 나노슬릿의 선폭보다 작은 크기의 미세입자가 나노슬릿 박막을 통과하지 않고 포획되어 검출되는지를 확인하는 실험을 진행하였다. 800 nm 선폭의 나노슬릿 칩에 450 nm 크기의 청색 형광염료가 포함된 나노입자를 $10^5/\text{mL}$, $10^6/\text{mL}$, $10^7/\text{mL}$ 농도로 준비하여 주입하였다. 그림 4-6은 100 μl 의 샘플용액을 나노슬릿 박막에 주입한 후 측정한 농도별 결과이다. 형광이미지 상으로 보았을 때에, $10^5/\text{mL}$, $10^6/\text{mL}$ 농도의 경우 대부분의 나노입자가 800 nm 크기의 나노슬릿 박막을 통과하여서 형광신호가 매우 낮음을 확인할 수 있었다. 하지만, $10^7/\text{mL}$ 농도의 경우, 상당히 많은 양의 나노입자들이 검출되는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 다수의 나노 입자가 한꺼번에 나노슬릿을 통과하면서 막히는 현상으로, 미세 유체채널의 keystone effect라고 보고되고 있다 [51]. 이러한 현상은 나노유체채널의 단면적과 기하학적 형태에 강하게 영향을 받는다. 그림 4-7은 550 nm 선폭의 나노슬릿 칩과 550 nm 크기의 나노홀 칩의 keystone effect를 비교 실험한 결과이다. 320 nm 크기의 나노입자를 100 μl 를 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 주입한 결과, 나노홀 칩은 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 에서 keystone

effect를 관찰할 수 있었다. 반면에 나노슬릿 칩은 $3 \times 10^8/\text{ml}$ 에서야 대부분의 나노입자들이 keystone effect에 의해서 포획되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 나노입자를 크기에 따라서 선택적으로 포획하기 위해서는 가늘고 긴 형태의 슬릿 구조가 적합하며, 샘플용액의 농도가 높을 경우에는 keystone effect에 의해서 실험이 실패할 가능성이 있으므로 희석작업을 통해서 농도를 낮추는 것이 바람직하다.

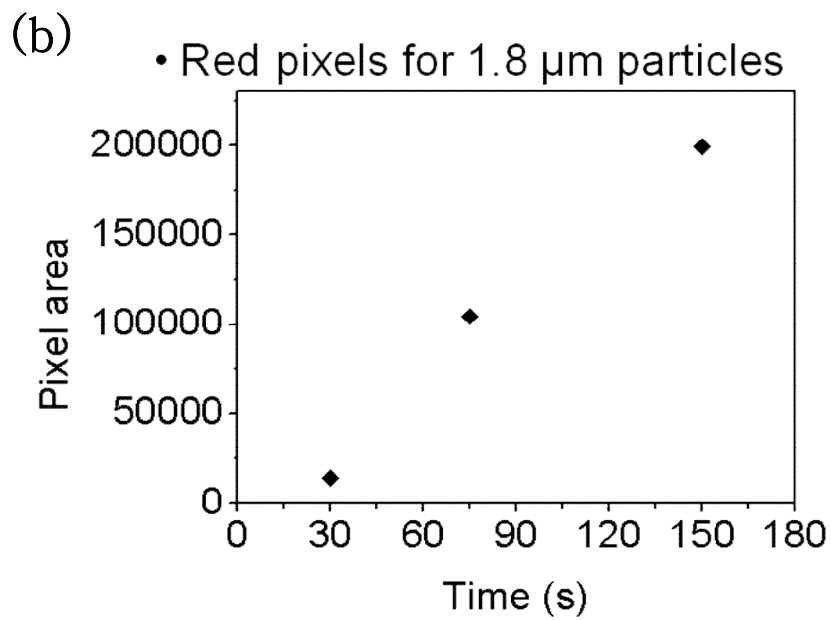
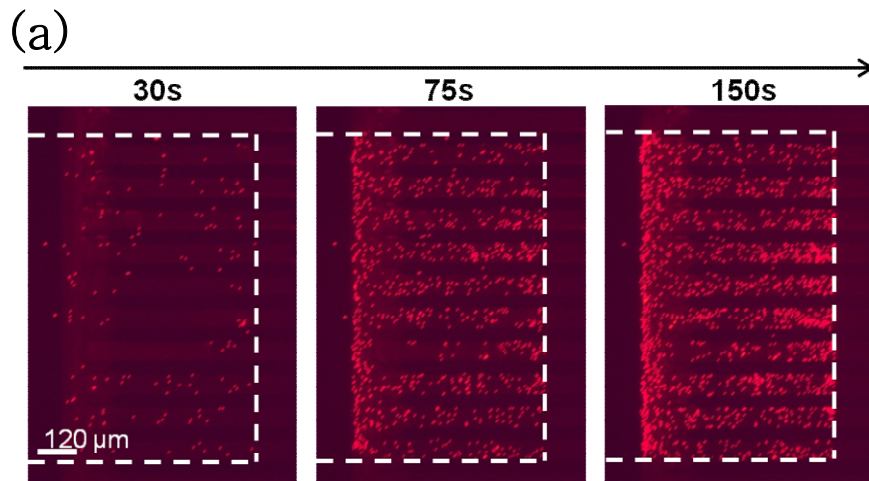


그림 4-5. 마이크로 입자 포획 실험: (a) 1.8 μm 의 미세입자를 주입한 결과 (b) 형광 신호 그래프.

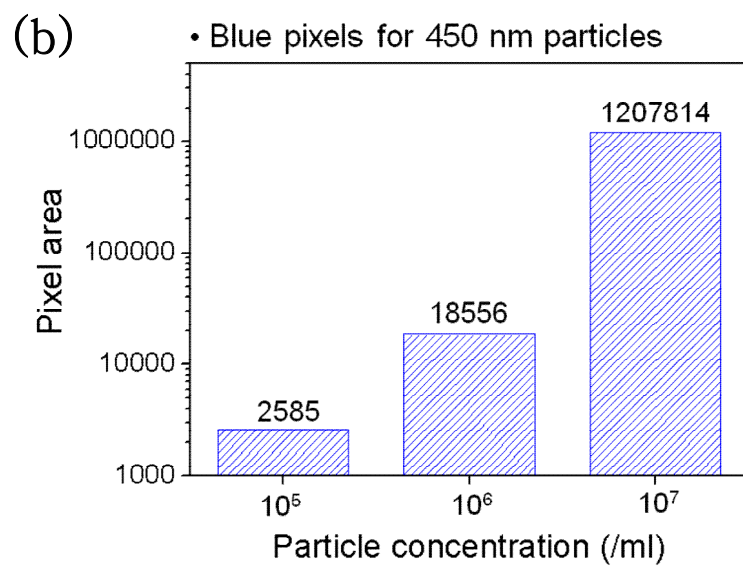
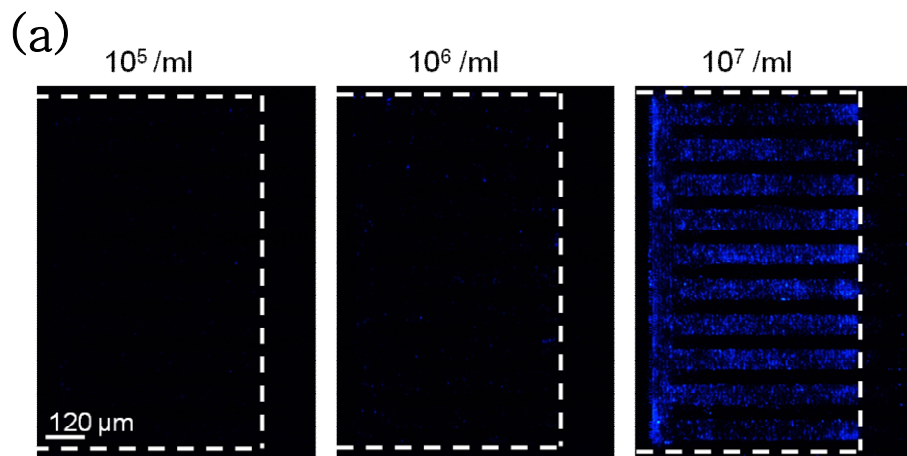
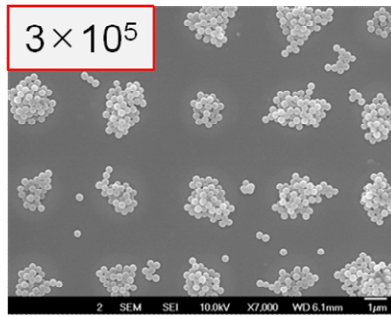
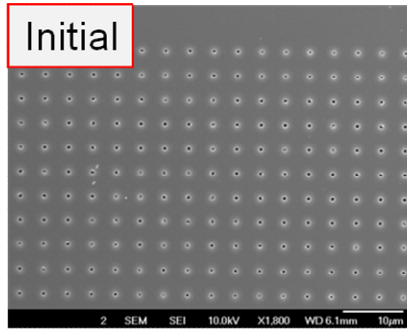


그림 4-6. 나노입자 여과 실험: (a) 800 nm 나노슬릿 칩에 450 nm 나노입자를 주입한 결과 (b) 형광 신호 그래프.

• Nanohole



• Nanoslits

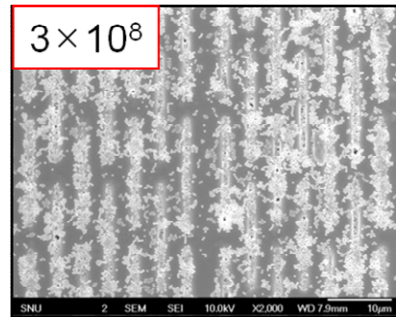
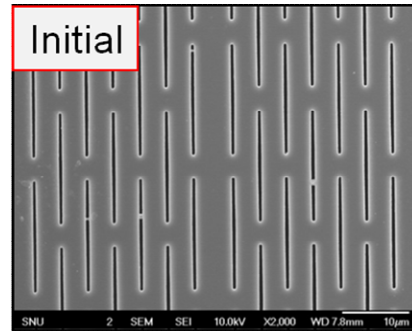


그림 4-7. 나노홀 칩과 나노슬릿 칩에서 나노입자의 농도별 여과실험.

마지막으로 서로 다른 크기를 가지는 2종류의 미세입자를 나노슬릿 칩에서 선택적으로 분리하는 실험을 진행하였다. 실험을 위해 1.8 μm 의 적색형광 마이크로 입자와 450 nm의 청색형광 나노 입자를 사용하였다. 나노슬릿 박막을 투과하여야 할 450 nm의 청색형광 나노 입자는 $10^5/\text{mL}$ 의 농도로 고정하였고, 나노슬릿에 포획되어 검출되어야 할 1.8 μm 의 적색형광 마이크로 입자는 $10^3/\text{mL}$, $10^4/\text{mL}$, $10^5/\text{mL}$ 의 농도로 준비하여 서로 섞어주었다. 이렇게 준비된 용액을 실린지 펌프를 이용하여서 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 속도로 5분간 총 200 μL 의 샘플을 나노슬릿 칩에 주입하였다. 이후 다시 D.I water를 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 속도로 2분 30초 간 주입하여 나노슬릿 칩 속에 남아 있을 미세입자들을 세척하였다. 유체 실험 후 형광현미경을 이용하여 각각의 파장에 대한 형광 이미지를 측정하였다. 그림 4-8은 각 농도별 샘플을 나노슬릿 칩에 주입 후에 측정한 형광이미지를 분석한 결과이다. 나노슬릿 칩에 포획되어야 할 1.8 μm 크기의 마이크로 입자는 농도가 증가함에 따라서 형광신호가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 $10^5/\text{mL}$ 의 고정된 농도로 주입된 450 nm의 나노 입자의 경우에는 대부분의 입자가 나노슬릿 박막을 통과한 것으로 보여지나, 1.8 μm 마이크로 입자의 농도가 높아질수록 나노 입자의 형광 신호도 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 1.8 μm 의 마이크로 입자가 포획되면서 나노슬릿 박막의 유체가 흐를 수 있는 단면적을 축소시켜, 많은 양의 나노 입자가 박막에 비특이적으로 포획 된 것으로 생각된다.

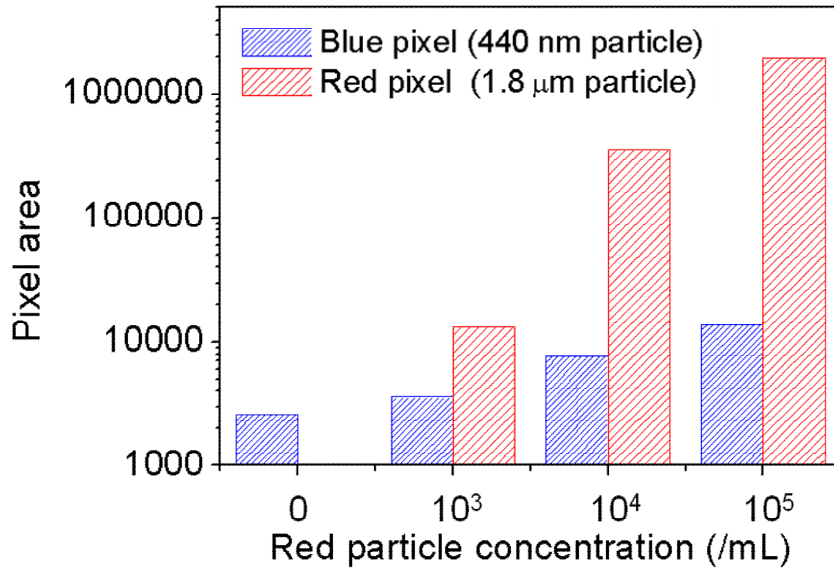


그림 4-8. 나노입자와 마이크로입자 분리/포획 실험: 2종류의 미세입자 (1.8 μm, 450 nm) 분리 실험 결과.

위의 실험 결과를 토대로, 나노슬릿 칩의 마이크로 입자와 나노 입자 분리 실험 결과를 미세입자 분리와 관련된 지표인, through-put과 purity로 정리하였다. 먼저 나노슬릿 칩의 박막에 실제 포획된 1.8 μm 입자의 개수를 추정하기 위해서 검출된 형광신호의 총합을 1.8 μm 입자 1개의 형광신호 값인 43.283으로 나누었다. 또한 나노슬릿 칩에 비특이적으로 포획된 450 nm 나노입자의 개수를 추정하기 위해서 450 nm 입자 1개의 형광신호 값인 2.705로 검출된 형광신호 값을 나누었다. 표 4-1는 포획된 마이크로 입자와 나노 입자들을 형광이미지에서 추정하여, through-put과 purity의 지표로 분석을 한 결과이다. 포획된 마이크로입자의 개수는 예상 주입량보다 2 ~3배 이상 많은 것으로 추정되었으나, 농도에 따라 전체적으로 10배씩 증가하는 것을 확인 할 수 있다. 또한 포획된 나노 입자의 수는 예상 주입량인 2×10^4 개 중 마이크로 입자의 포획 정도에 따라 최소 6.5%에서 최대 23.3%까지 포획되는 것으로 추정된다. 또한 마이크로 입자가 저 농도일 때에도 나노입자들이 6% 이상 검출되는 것으로 볼 때, 나노입자들이 keystone effect 현상으로만 검출되는 것이 아니라, 일정량의 나노 입자들은 나노슬릿 박막 표면에 비특이적으로 결합하여 있을 것으로도 생각된다.

표 4-1. 마이크로 입자와 나노입자의 분리 결과.

Target particles /Total particles	1:100	1:10	1:1
Microparticles (target)	267	7783	42079
Nanoparticles	1303	2734	4675
Throughput	1.78/s	51.89/s	284.73/s
Purity	17%	74%	90%

4.3.3 형광 측정을 통한 미세 입자 검출의 정량화

본 연구에서 제안하는 미세입자 분리 및 검출은 나노슬릿 박막에 포획된 입자의 형광 신호를 기반으로 한 검출 방법이다. 따라서 나노슬릿 박막에서 발생하는 형광 신호가 실제 포획된 미세입자의 개수를 정량적으로 나타내고 있는지, 신호 및 검출 방법에 대한 신뢰도를 평가할 필요가 있다. 이를 확인하기 위해, 1.8 μm 마이크로 입자를 포획한 나노슬릿 박막을 형광 현미경으로 측정한 후 같은 영역을 전자 현미경으로 비교하는 분석을 수행하였다. 형광이미지를 분석 하는 프로그램으로는 NI Vision Assistant 프로그램을 이용하였다.

그림 4-9는 미시적인 관점에서 미세입자의 개수가 1개, 2개, 3개일 때의 형광 신호 크기를 분석하여 나타낸 것이다. 포획된 미세입자의 개수와 비례하여 형광신호의 크기가 증가함을 알 수 있다. 다음으로 좀더 거시적인 관점에서 형광신호를 분석하기 위해서 나노슬릿 박막의 여러 영역에 대해서 형광신호와 전자현미경 이미지를 비교하는 분석을 수행하였다. 마이크로 입자를 포획하는 실험을 진행한 후 총 15개의 영역($84 \mu\text{m} \times 64 \mu\text{m}$ 크기)을 지정하여서 이미지 분석을 수행하였다. 형광 신호에 대한 분석의 경우 앞서 언급한 이미지 분석 프로그램을 이용하였으며, 전자현미경 이미지의 경우에는 수작업으로 미세입자의 개수를 세어서 정량화 하였다. 이렇게 분석결과를 x축은 전자현미경 이미지에서 얻을 미세입자의 개수를, y축은 이에 대응하는 형광 신호 값으로 나타내었다 (그림 4-10). 미세입자의 개수와 형광신호 값을 비교한 결과 R^2 이 0.96559로 형광신호가 미세입자의 개수와 매우 선형적인 관계를 가지고 있음을 확인하였다.

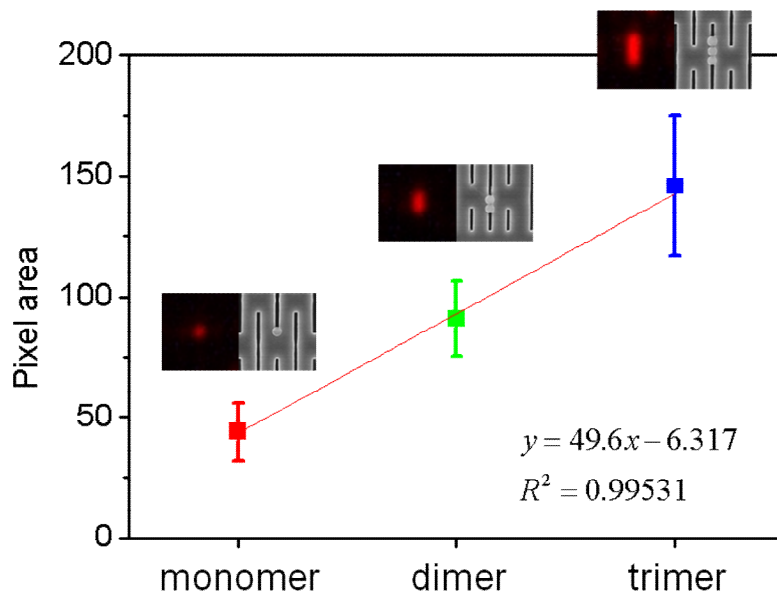


그림 4-9. 미세입자의 개수에 따른 형광 신호의 크기 (1개, 2개, 3개).

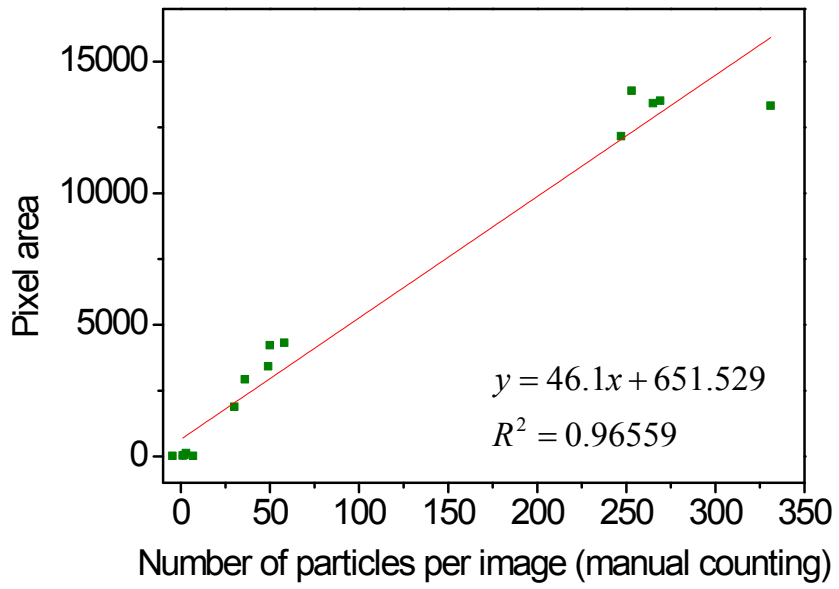


그림 4-10. 포획된 미세입자의 개수와 형광신호의 비교.

4.4 나노슬릿 칩의 단백질 응집 반응 검출에의 응용

나노입자 기반의 응집반응검사는 바이러스나 DNA, 혈액 검사와 같은 다양한 생화학 물질의 검출 광범위하게 이용되고 있다 [52]. 바이러스와 같이 검출하고자 하는 물질이 존재하면 이물질을 매개로 나노입자들이 서로 붙어서 응집하게 되고, 나노입자 복합체 (nanoparticle agglomer)가 되어 크기가 커지게 된다. 응집된 나노입자 집합체를 검출하는 방법은 핵자기공명(nuclear magnetic resonance)나 레이저동적산란(dynamic laser scattering) 같은 대형장비를 이용하거나, 이미지 프로세스를 통해서 크기가 큰 입자들을 카운팅하는 방식이 사용되고 있다 [53-57]. 이러한 검출 방식은 한 종류의 나노입자만 사용하면 되고, 전체 실험과정도 복잡하지 않아 비교적 간단하고 저렴한 검출 방법으로 분류된다.

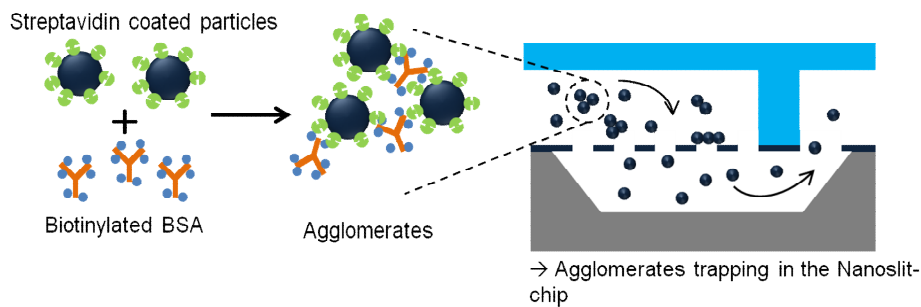


그림 4-11. 나노슬릿 칩을 이용한 응집반응검사 검출실험의 개념도.

따라서, 만약 본 연구에서 개발한 나노슬릿 칩의 미세 입자 분리 포획 기능을 활용하여 응집반응검사 후 생성된 나노입자 집합체들만을 나노슬릿 박막에 포획한다면, 정량적으로 응집반응을 검출할 수 있을 것으로 생각된다. 이를 위해 그림 4-11과 같이 나노슬릿 칩에서 응집반응검사를 검출하는 실험을 진행하였다. Biotinylated bovine serum albumin을 (b-BSA) 목표 단백질로 하였고, 스트렙타비딘 단백질이 코팅된 450 nm 형광나노입자들이 b-BSA를 매개로 응집반응이 이루어지도록 하였다. 응집반응이 끝난 샘플 용액은 800 nm 나노슬릿 칩에 주입하여 응집된 나노입자 집합체만이 나노슬릿에 포획되어 검출될 수 있도록 하였다. 구체적인 실험 조건은 다음과 같다. b-BSA의 농도를 0 M, 10 pM, 100 pM, 1 nM로 나눠서 준비하고, 스트렙타비딘이 코팅된 형광나노입자를 $10^7/\text{ml}$ 의 농도로 집어 넣어서 상온에서 5시간 동안 반응시켰다. 이후 샘플 용액을 100배 희석 하여서 반응이 정지되도록 하고, 희석된 용액의 400 μl 를 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 10분간 나노슬릿 칩에 주입하고 형광을 측정하였다. 그림 4-12는 타겟 단백질인 b-BSA의 농도에 따른 나노슬릿 칩의 검출 결과이다. b-BSA 단백질의 농도에 따라서 검출되는 나노입자의 수가 증가하고 형광신호도 증가하는 것을 알 수 있다. 나노슬릿 칩을 이용한 b-BSA의 검출한계는 10 pM이고, 검출범위(dynamic range)는 10 pM에서 1 nM 였다. [58-61].

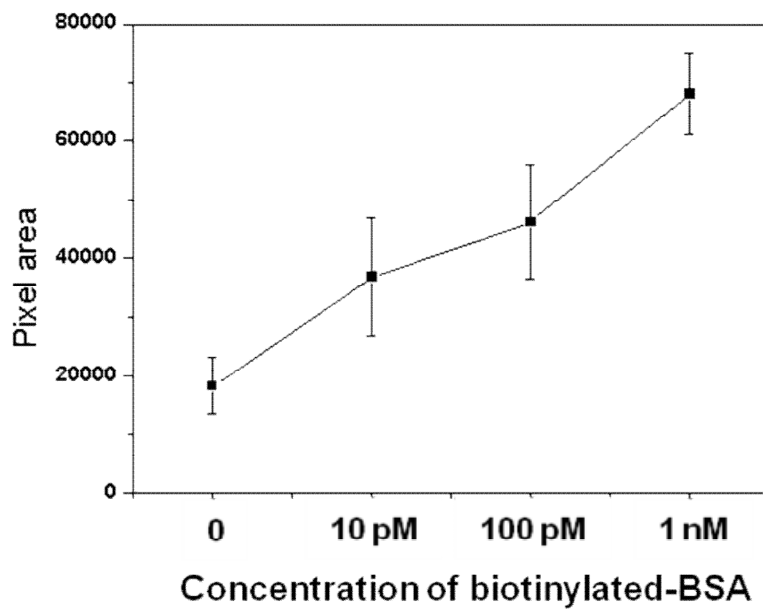


그림 4-12. 나노슬릿 칩에서 biotinylated BSA 단백질의 검출결과.

4.5 요약 및 검토

본 장에서는 제작된 나노슬릿 칩의 특성 및 성능을 평가한 실험에 대해서 기술하였다. 먼저 나노슬릿 칩의 유체저항 및 체적흐름을 측정하기 위한 실험 구성 및 측정 결과를 기술하였다. 제작된 나노슬릿 칩은 가해지는 압력에 따라서 유체의 체적흐름이 선형적으로 증가하였으며, 이는 나노슬릿의 선폭이 300 nm에서 500 nm 정도의 크기를 가질 때 이론적인 체적흐름의 범위에 속하는 값이다.

다음으로 800 nm 선폭의 나노슬릿 칩에 1.8 μm , 450 nm 크기의 미세입자를 농도별로 주입하여서 크기에 따라 분리할 수 있는지를 실험하였으며, 실험 결과 일정 농도 이하의 샘플 용액에 대해서는 크기에 따라 분리 및 검출이 가능함을 확인하였다. 하지만, 미세입자의 크기가 나노슬릿의 선폭보다 작더라도, 고농도로 주입되거나, 나노슬릿 박막이 다른 입자나 물질에 의해서 막혀있는 경우에는 미세입자의 분리 성능이 저하되는 것을 알 수 있었다.

나노슬릿 박막에 포획된 미세입자를 형광현미경을 통해서 검출하는 방법의 신뢰성을 검증하였다. 미세입자 포획 실험을 진행 후, 일정 영역의 나노슬릿 박막을 형광현미경과 전자현미경으로 측정하여서 비교하였다. 분석 결과 나노슬릿 박막에 포획된 미세입자에서 발생하는 형광신호의 크기가 실제 포획된 미세입자의 개수와 비례하는 것을 알 수 있었다. 따라서 나노슬릿 칩의 미세입자 포획을 형광신호를 이용하여 검출하는 것은 적절한 검출 방법으로 생각된다.

마지막으로 본 연구에서 제작된 나노슬릿 칩을 응집반응검사를 통한 단백질 검출에 이용하는 시도를 하였다. b-BSA 단백질의 농도에 따라 집합체를 이루어서 크기가 커진 나노입자 집합체들을 800 nm의

나노슬릿 칩에서 포획하여서 검출하는 실험을 수행하였고, b-BSA 단백질을 10 pM에서 1nM 범위에서 성공적으로 검출 할 수 있었다.

제 5 장 마이크로 비드 어세이를 위한 나노슬릿 칩 기반의 검출 시스템

5.1 서론

본 장에서는 연구의 최종 목표인 마이크로비드 어세이의 검출 한계를 향상시키기 위한 플랫폼인 나노슬릿 칩 기반의 검출 시스템에 대해서 기술한다. 제안하는 검출 시스템은 바이오 어세이(bio-assay)에 의해 마이크로비드와 특이적으로 결합된 형광 나노입자들을 반응이 끝난 후 따로 분리하여내어 나노슬릿 칩에 포획 및 농축하여 검출하는 방식이다. 이러한 검출 방식은 반응이 일어난 나노입자들을 마이크로 비드로부터 분리하여 나노슬릿 박막에 포획하여 신호를 읽어냄으로써 마이크로 비드의 3차원 구조에 의한 광신호의 왜곡을 근본적으로 차단하고, 나노입자들을 좁은 검출 영역에 농축함으로써 어세이의 검출 한계를 높일 수 있다.

전체 검출시스템은 마이크로비드를 충전하여 어세이를 수행하는 마이크로비드 어세이 칩과 어세이가 끝난 후에 마이크로비드와 결합한 형광 나노입자를 포획하여 검출하는 나노슬릿 칩으로 구성되어 있다. 마이크로비드 어세이 칩은 30 μm 크기의 마이크로비드들을 충전 할 수 있는 유체 채널이 있어 바이오 어세이를 수행할 수 있다. 시스템에 사용된 나노슬릿 칩은 450 nm 입자를 포획하기 위하여 250 nm 정도의 선폭을 가지도록 제작하였다.

나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 성능을 평가하기 위한 실험으로

펩타이드 - 스트렙타비딘 검출 실험을 수행하였다. 스트렙타비딘 단백질과 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드 서열 Leucine - Histidine - Proline - Glutamine - Phenylalanine (LHPQF)를 마이크로비드에 합성하고, 스트렙타비딘이 코팅된 450 nm 크기의 형광 나노입자를 검출하는 실험으로 시스템의 성능을 평가하였다. 이를 위해, 실린지 튜브 상에서 펩타이드 마이크로비드와 스트렙타비딘 형광나노입자를 반응시킨 후 반응이 일어난 형광나노입자들을 마이크로비드에서 분리하여 나노슬릿 칩에 주입하는 기초 실험을 진행하였다. 기초 실험의 결과를 토대로 마이크로비드에 결합한 형광나노입자의 신호와 나노슬릿에서의 형광신호를 비교하여 나노슬릿의 나노입자 포획 및 농축이 신호민감도에 주는 영향을 조사하였다. 다음으로는 마이크로비드 어세이 칩과 나노슬릿 칩으로 구성된 전체 검출시스템에서 펩타이드 - 스트렙타비딘 어세이를 수행하였다. 형광 나노입자를 $1.25 \times 10^6/\text{ml}$ 에서 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 농도로 준비하여 실험하였으며, 마이크로비드의 형광 신호와 나노슬릿에서의 형광신호를 비교하여 최종적으로 마이크로비드에서 보다 나노슬릿에서의 형광신호가 얼마나 증가하는지 비교하여 기술하였다.

마지막으로 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 실제적인 응용으로, 스트렙타비딘 단백질과 결합할 수 있는 펩타이드 서열 후보군들의 스트렙타비딘 단백질에 대한 친화력 검사 실험을 진행하였다. 실험을 위해 3종류의 서로 다른 펩타이드 서열들을 합성하여 준비하였고, $1 \times 10^7/\text{ml}$ 의 스트렙타비딘 형광나노입자를 검출하는 실험을 진행하여 펩타이드 서열의 스트렙타비딘 단백질에 대한 친화력을 측정하였다.

5.2 Test tube 어세이 및 기초 실험

펩타이드 LHPQF가 합성된 마이크로비드와 스트렙타비딘 형광나노입자를 이용한 기초 실험의 과정은 그림 5-1과 같다. 먼저 $10^4/\text{ml}$ 농도의 마이크로비드 1 ml에 $1.25 \times 10^7/\text{ml}$, $2.5 \times 10^7/\text{ml}$, $5 \times 10^7/\text{ml}$, $10^8/\text{ml}$ 농도의 스트렙타비딘 형광나노입자를 넣고 상온에서 1시간 반응시킨다. 반응이 끝난 후, PBS (0.01 M, pH 7.0) 용액으로 세척하여서 반응이 정지되도록 한다. 어세이 결과를 측정하기 위해서는 slide glass에 샘플 용액을 $10 \mu\text{l}$ 떨어뜨려 마이크로비드의 형광신호를 측정을 하였다. 또한, 실린지 튜브 상에서 펩타이드와 스트렙타비딘이 선택적으로 결합하는지를 검증하기 위한 실험으로, 표면에 아민기가 결합된 마이크로비드와 스트렙타비딘 형광나노입자를 같은 조건으로 반응시키는 대조군 실험도 진행하였다.

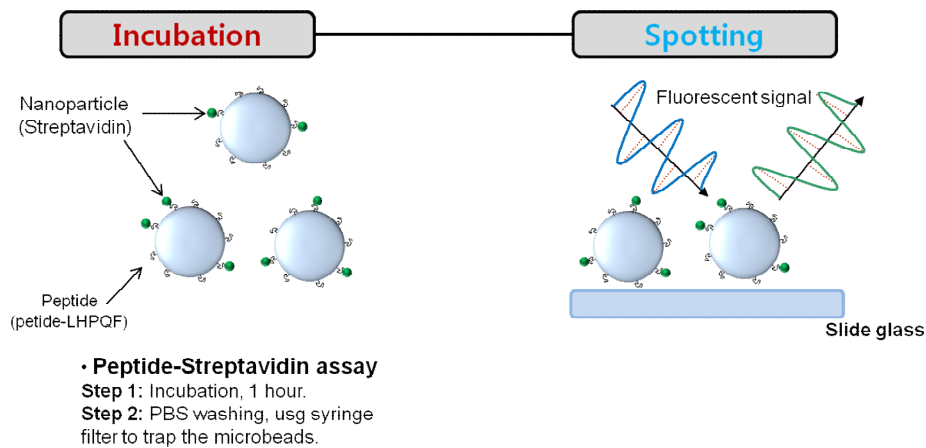


그림 5-1. 펩타이드 - 스트렙타비딘 어세이의 기초 실험.

어세이를 통해 획득한 형광이미지의 신호를 정량화하기 위해서 National Instrument사의 Vision Assistant 프로그램을 이용하였다. 이미지 프로세스는 그림 5-2와 같이 진행되었다. 먼저, 획득한 형광이미지를 프로그램에서 불러들인다. 다음으로, Vision Assistant 프로그램의 color plane extraction 기능을 이용하여 획득한 형광이미지의 green 값을 추출하여 8bit gray scale로 변환하고, 마지막으로 Histogram 기능을 이용하여 검출 영역의 평균 신호세기 값과 표준편차를 구한다. 실험에서 획득한 모든 실험 결과들은 그림 5-2과 같은 프로세스로 정량화가 되었으며, 형광신호를 검출하고자 하는 대상이 단일 마이크로비드, 충전 구조의 마이크로비드, 또는 나노슬릿인지에 따라서 histogram의 검출 영역을 조절하여 진행하였다. 펩타이드 - 스트렙타비딘 기초실험의 경우, 단일 마이크로비드의 중앙 $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 영역에 대한 형광신호를 구하여 정량화하였다.

그림 5-3는 스트렙타비딘 형광나노입자의 농도에 따른 어세이 결과이다. 마이크로비드에서 나오는 형광 신호의 세기가 형광나노입자의 농도에 비례하는 것을 알 수 있다. 또한 대조군 실험의 결과를 보면 농도에 따른 형광신호의 경향성이 관찰되지 않는다. 따라서 마이크로비드의 표면에 붙은 나노입자들은 펩타이드-스트렙타비딘 반응에 의해서 특이적으로 결합한 것이며, 마이크로비드와 스트렙타비딘 단백질의 비특이적 결합은 잘 일어나지 않음을 알 수 있다. 그림 5-4의 (a)는 펩타이드-스트렙타비딘 어세이의 결과를 이미지 프로세스하여 나타낸 그래프이고, (b)는 대조군 실험의 결과이다.

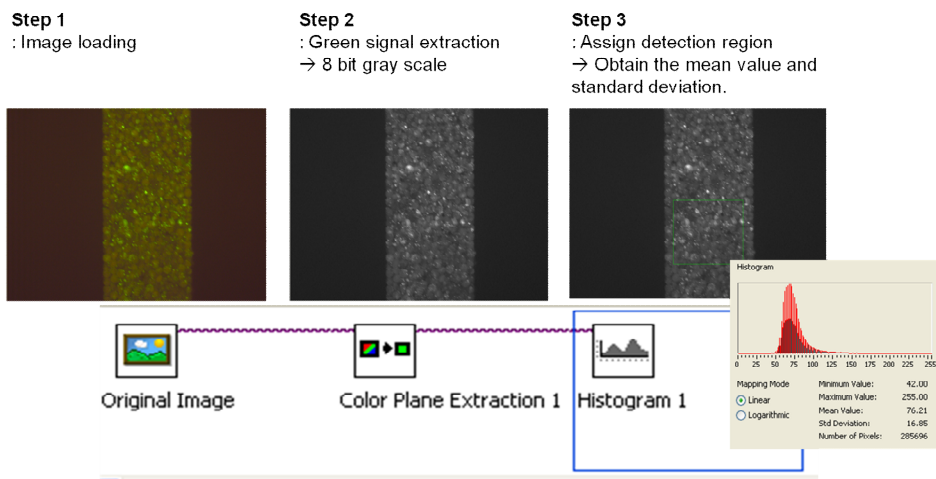


그림 5-2. 형광이미지 프로세스 과정.

• Spotting based fluorescent signal detection

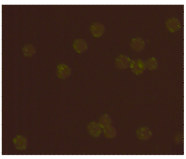
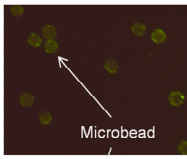
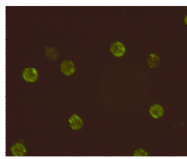
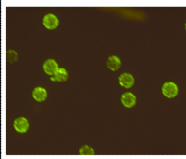
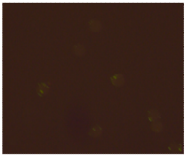
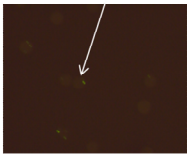

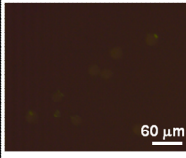
Target NP concentration	1.25×10^7	2.5×10^7	5×10^7	10^8
peptide – streptaivdin binding				
non-specific binding				

그림 5-3. Test tube 펩타이드 – 스트렙타비딘 어세이 결과.

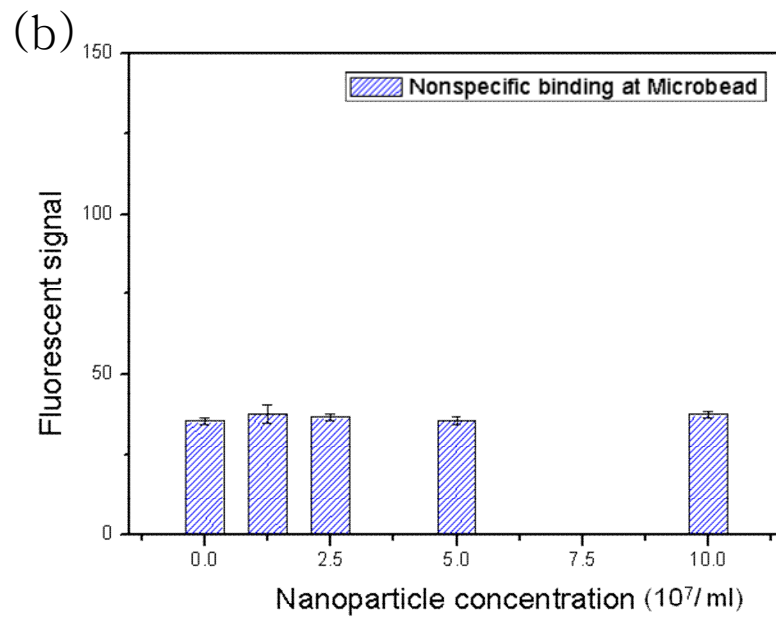
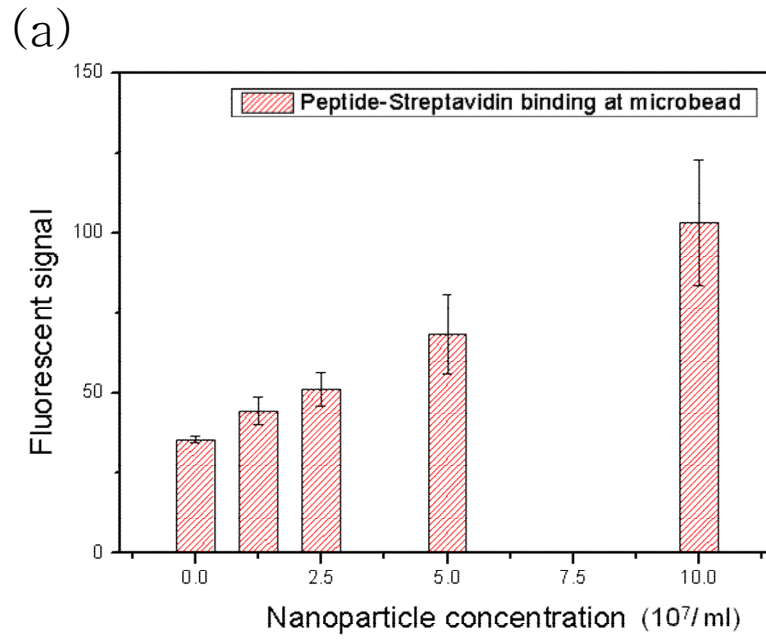


그림 5-4. Test tube 실험의 결과 그래프: (a) 어세이 실험 (b) 대조군 실험.

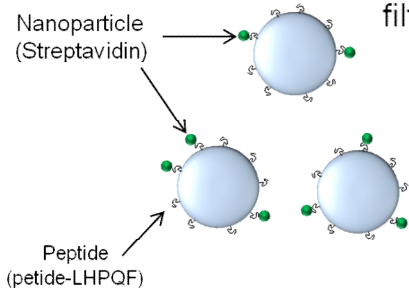
다음 단계의 기초실험으로 그림 5-5와 같이 실린지 튜브상에서 펩타이드-스트렙타비딘 반응을 일으킨 후, 반응에 의해 마이크로비드의 표면에 결합된 형광나노입자들을 다시 분리하여 나노슬릿 칩에서 검출하는 실험을 수행하였다. 마이크로비드의 표면에 결합된 형광나노입자를 분리하기 위해서는 먼저 펩타이드-스트렙타비딘의 결합이 끊어져야 한다. 이를 위해서 포름아미드 (formamide)를 상온에서 1시간 반응시켰다. 하지만, 펩타이드-스트렙타비딘 결합이 포름아미드에 의해 제거가 되더라도 나노입자가 마이크로비드의 표면에 물리적으로 흡착되어 있어서 쉽게 분리되지 않을 수 있다. 따라서 형광나노입자들이 마이크로비드에서 분리할 수 있도록 물리적인 충격을 주는 것이 바람직하다. 그림 5-6는 실린지 튜브에서 펩타이드 - 스트렙타비딘 어세이를 수행한 후에 나노입자를 마이크로비드로부터 분리하기 위한 조건실험 결과이다. 마이크로비드의 표면에 결합된 형광나노입자들을 포름아미드 용액 처리를 하고, vortexing(5분) 또는 sonication(10분)를 이용하여 샘플 용액에 물리적인 충격을 가하여 주었다. 초음파세척(sonication)의 경우에는 마이크로비드의 형광신호가 감소하기는 하였지만 감소량이 매우 작았고, vortexing의 경우에는 대부분의 형광나노입자가 분리되는 것을 확인하였다. 따라서 형광나노입자를 마이크로비드로부터 분리하기 위해서 샘플 용액에 포름아미드 처리와 vortexing을 가하는 것으로 조건을 확립하였다.

Incubation

• Peptide-Streptavidin assay

Step 1: Incubation, 1 hour.

Step 2: PBS washing, use syringe filter to filter the microbeads.

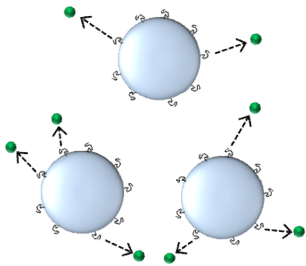


NP release

• Release process

Step 1: Formamide, chemical treatment to break the peptide-streptavidin binding.

Step 2: **Vortexing**, Apply physical shock to separate microbeads & nanoparticles.



NP collection

• NP collection & detection

Step 1: Injection the released nanoparticle (40 uL).

Step 2: Measure the fluorescent signal.

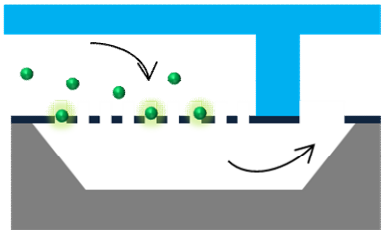


그림 5-5. Test tube 어세이의 나노슬릿 칩 기반 검출.

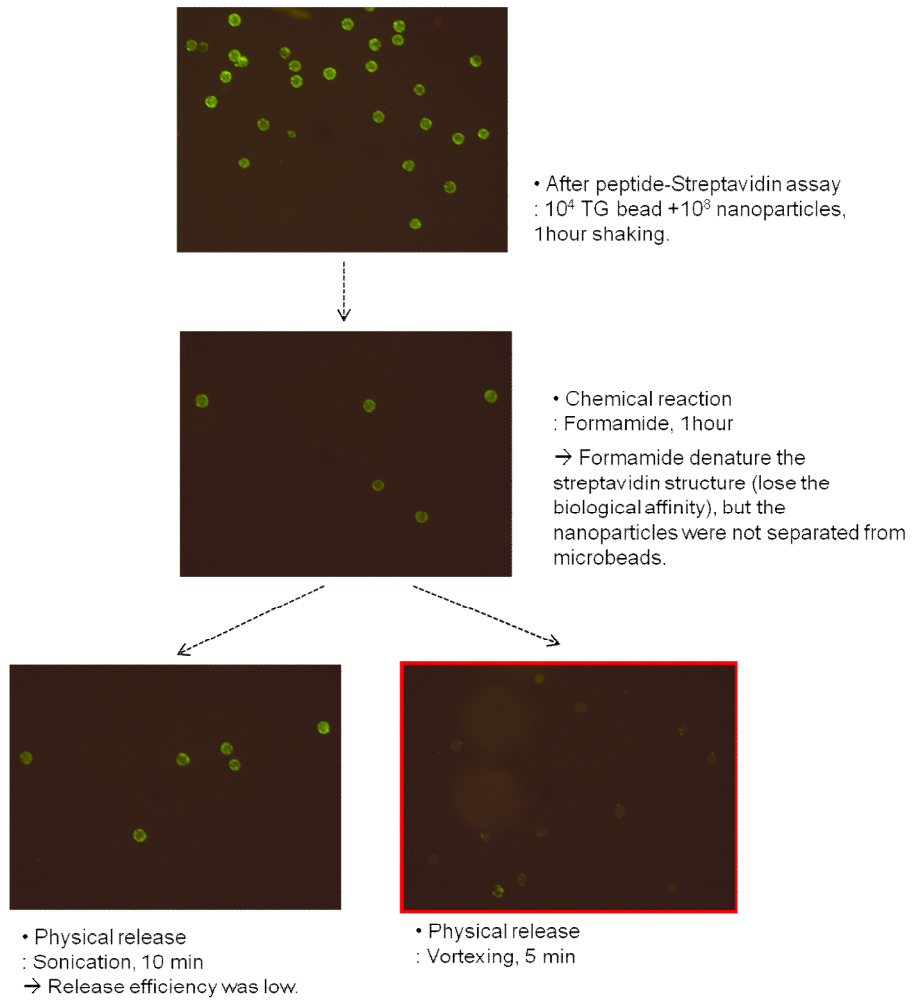
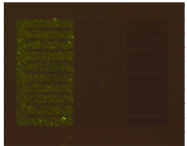
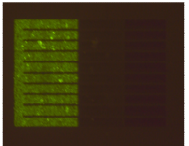
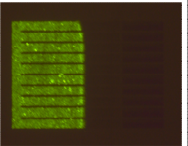
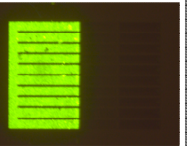
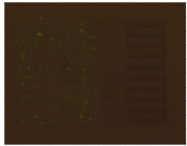
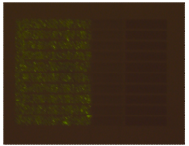
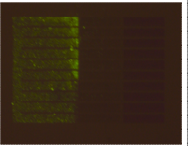
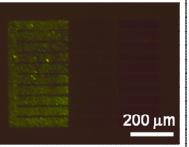


그림 5-6. 마이크로비드에서 형광나노입자를 분리하는 조건실험.

그림 5-7는 펩타이드-스트렙타비딘 반응을 test tube에서 진행한 후, 마이크로비드 표면에 존재하는 형광나노입자를 분리하여 총 1 ml의 샘플 용액 중에 40 μl 만을 나노슬릿 칩에 주입한 결과이다. 대조군 실험으로는 표면에 아민기만 있는 마이크로비드와 스트렙타비딘을 반응시킨 후 나노슬릿 칩에 동일한 양을 주입하는 실험을 진행하였다. 정량화된 데이터로 비교를 하기 위하여, 이미지 프로세스를 통해서 나노슬릿 칩의 형광신호를 분석하였다. 그림 5-8는 어세이 실험과 대조군 실험에 대해서 나노슬릿의 400 $\mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ 영역의 형광신호를 분석하여 평균세기와 표준편차를 구하여 그래프로 나타낸 것이다. 어세이 실험의 경우 형광 신호의 세기가 나노입자의 농도에 비례하여서 증가하는 것을 확인할 수 있으며, 대조군 실험에서의 검출된 형광신호는 매우 낮은 수준임을 알 수 있다.

• Nanoslit based fluorescent signal detection

Target concentration	1.25×10^7	2.5×10^7	5×10^7	10^8
peptide – streptaivdin binding				
non-specific binding				 200 μm

• SEM image of the nanoslit membrane

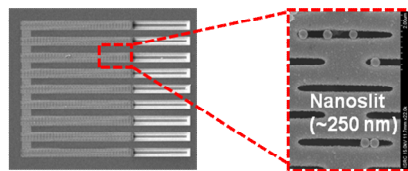


그림 5-7. Test tube 실험의 나노슬릿 칩 기반 검출 결과.

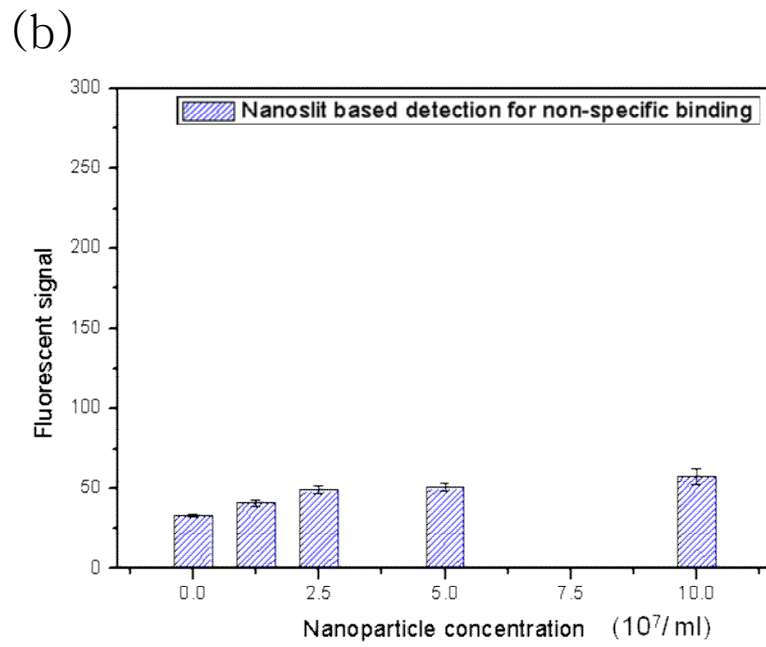
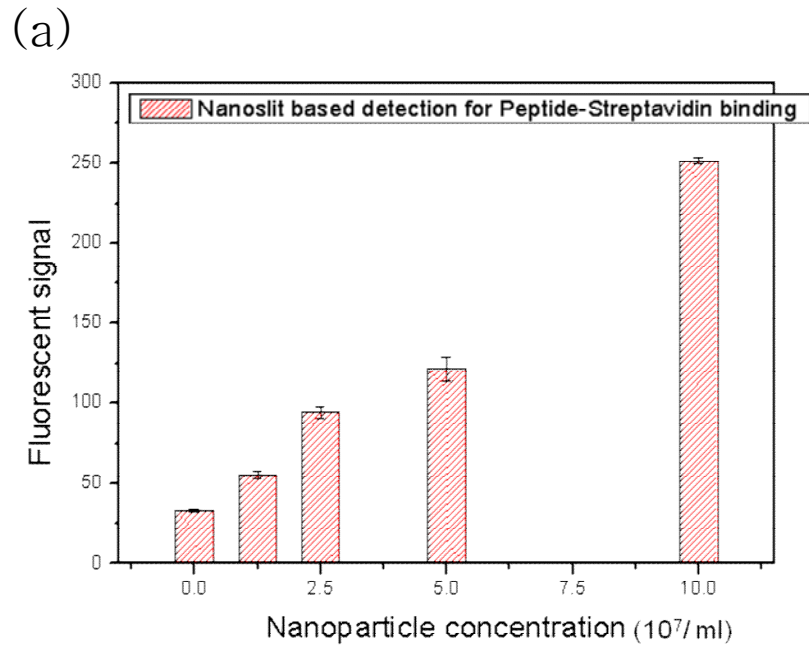


그림 5-8. Test tube 실험의 나노슬릿 칩 기반 검출의 결과 그래프: (a) 어세이 실험 (b) 대조군 실험.

그림 5-9은 펩타이드 - 스트렙타비딘 어세이에 따른 마이크로비드와 나노슬릿 칩 기반 검출의 형광신호를 비교하여 나타낸 것이다. 그래프를 보면, 형광나노입자의 농도가 증가할수록 나노슬릿 칩 기반 검출의 형광신호 세기가 급격하게 증가하는 것을 확인 할 수 있다. 따라서, 나노슬릿 칩 기반의 검출은 나노입자의 농축효과로 인해서, 형광신호의 기울기가 높아지고, 신호의 분해능이 마이크로비드의 측정 결과보다 좋해지는 것을 알 수 있다. 이는 검출한계의 향상에 기여할 수 있으며, 그림 5-9의 $1.25 \times 10^7/\text{ml}$ 의 형광 나노입자 검출 결과에서 경우에도 신호의 세기가 약 2배 이상 차이가 나는 것을 확인 할 수 있다.

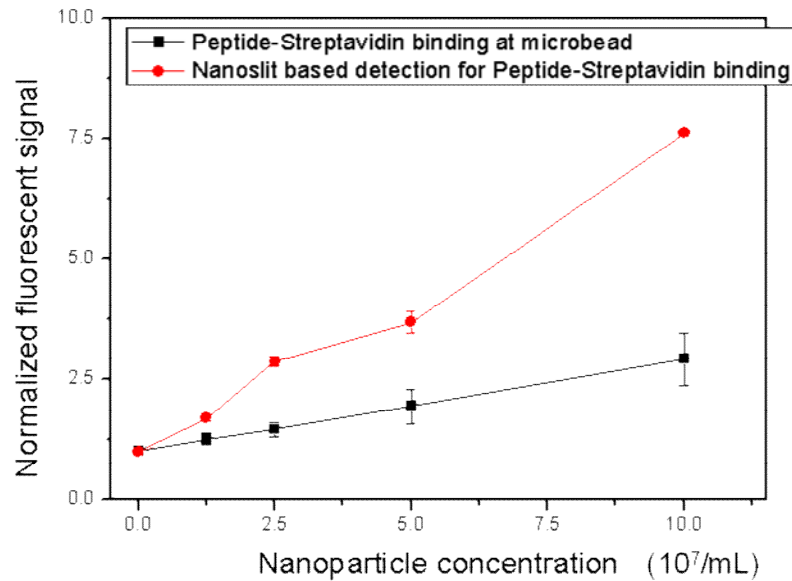


그림 5-9. Test tube 어세이의 마이크로비드와 나노슬릿 칩 기반 검출의 형광신호 비교.

5.3 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템을 이용한 펩타이드-스트렙타비딘 어세이

5.3.1 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템의 구성

그림 5-10는 본 논문에서 최종적으로 제안하는 마이크로비드 어세이를 위한 나노슬릿 칩 기반의 검출시스템의 개념도이다. 검출시스템의 첫 번째 소자인 마이크로비드 어세이 칩은 PDMS와 유리로 구성되어 있다. PDMS 유체채널은 높이 80 μm , 폭 500 μm 로 30 μm 크기의 마이크로비드를 이용한 어세이를 하기에 적합한 마이크로 유체채널이며, 채널의 끝 단에는 채널의 높이가 80 μm 에서 20 μm 로 감소하는 댐 형태의 구조물(weir structure)이 있어 30 μm 크기의 마이크로비드들이 칩의 유체채널 안에 포획될 수 있도록 하였다. 검출시스템의 두 번째 소자인 나노슬릿 칩은 스텝퍼 공정과 Cr/Au sputtering 공정을 이용하여 제작하였으며, 250 nm \times 4 μm 크기의 나노슬릿을 가지도록 하였다.

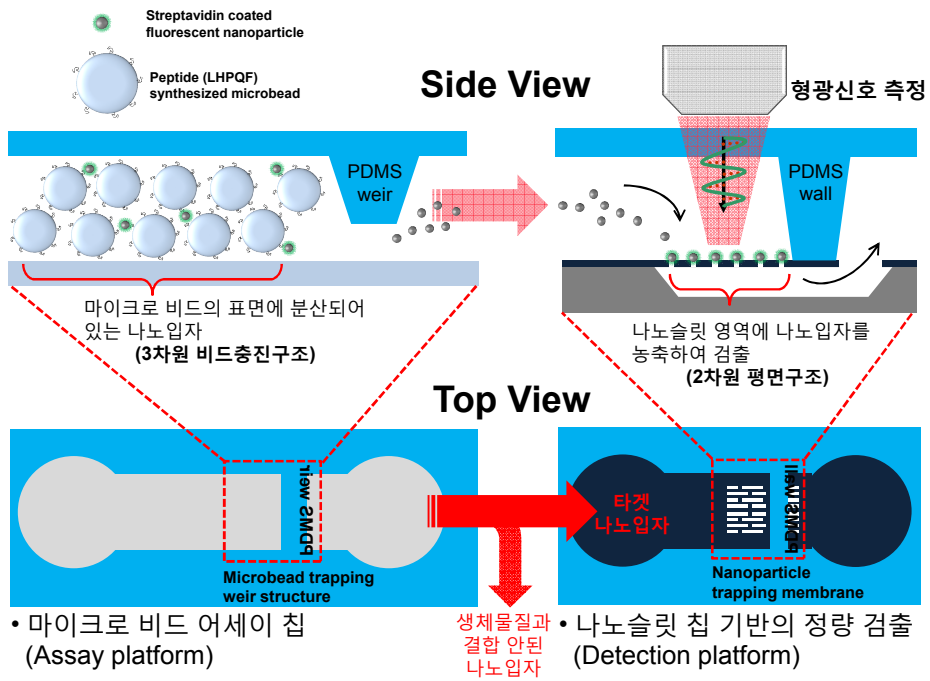


그림 5-10. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 개념도.

그림 5-11은 마이크로비드 어세이 칩과 나노슬릿 칩을 연계하여서 완성한 나노슬릿 유체소자 기반 검출 시스템의 전체 구성을 나타낸다. 마이크로비드 어세이 칩과 나노슬릿 칩은 유체튜브를 (tygon tube) 통해 레저버와 연결하였다. 연결된 두 개의 칩의 유체흐름을 제어하기 위한 장치로 압력 기반 펌프(MFSC, fluigent사, France)와 솔레노이드 밸브(solenoid valve, The Lee Company)를 이용하였다. 압력 펌프에서 생성되어 샘플 용액에 가해지는 압력을 솔레노이드 밸브와 Labview 프로그램을 이용하여 컴퓨터로 조절할 수 있도록 하였다. 압력 기반 펌프와 솔레노이드 밸브를 이용한 유체제어 방식은 Lab-on-a-chip 유체 제어에서 가장 많이 사용되는 실린지 펌프보다 유체 제어에 필요한 응답시간이 매우 짧다는 장점이 있다. 압력 기반 펌프와 솔레노이드 밸브를 이용하여 마이크로 비드어세이 칩의 입구와 출구에 가해지는 압력을 빠르게 제어하면, 미세유체채널 안에서 mixing이 발생하여 마이크로 비드와 나노입자들이 효율적으로 반응할 수 있다. 또한, 포획된 나노입자를 마이크로비드의 표면에서 분리할 경우에는 마이크로 비드를 높은 압력으로 빠르게 흔들어 주어, 비드들이 유체채널의 벽에 부딪치면서 발생하는 충격으로 인해 나노입자가 분리되도록 할 수 있다.

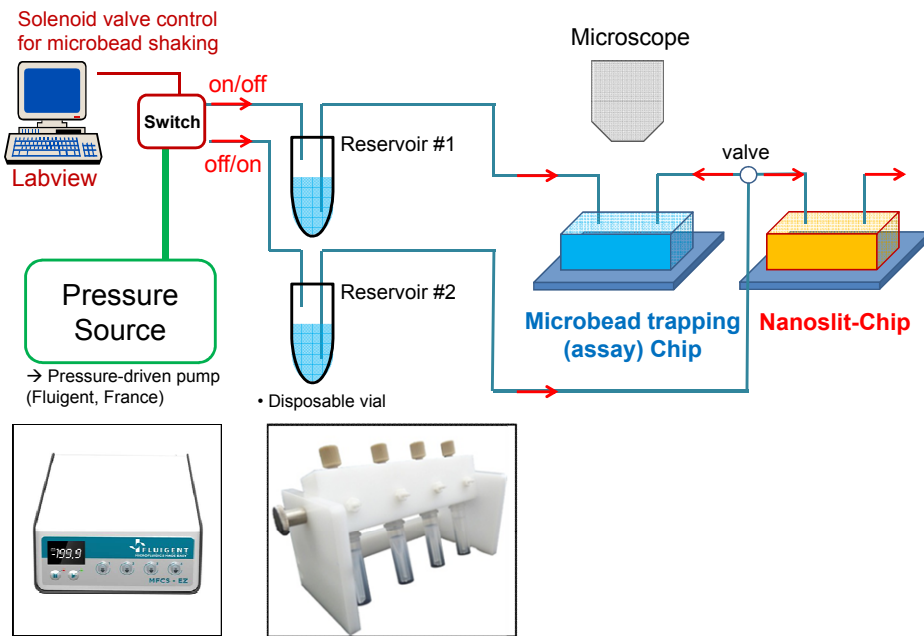


그림 5-11. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 구성.

5.3.2 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템의 실험 과정

스트렙타비딘이 코팅된 나노입자를 펩타이드 LHPQF가 합성된 마이크로 비드로 포획하는 실험 과정은 그림 5-12에 나타나 있다. (i) 먼저 마이크로비드를 마이크로비드 어세이 칩에 주입하여 유체 채널의 $4\text{ mm} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ 영역에 약 1500 ~ 2000 개의 비드가 충전 되도록 한다. (ii) 다음으로는 스트렙타비딘이 코팅된 나노입자를 주입하여서 마이크로비드와 나노입자를 30분간 반응시킨다. Labview 프로그램을 이용하여 마이크로비드 어세이 칩의 입구(inlet)과 출구(outlet) 방향에 1.5 kPa의 압력을 각각 2.8초, 1.2초씩 인가되도록 조절하여, 나노입자와 마이크로비드가 충전 된 영역이 앞뒤로 섞이면서 흘러가 반응이 잘 일어나도록 한다. (iii) 반응이 끝난 후에는 세척과정을 10분간 진행하여 마이크로비드의 표면에 결합하지 않는 나노입자들은 모두 걸러낸다. 세척과정 또한 칩의 입구(inlet)과 출구(outlet) 방향에 1.5kPa의 압력을 각각 2.8초, 1.2초씩 인가되도록 조절하여서 유체가 앞뒤로 섞이면서 흘러가도록 한다. 유체를 앞뒤로 섞으면서 세척하는 이유는 충전 된 마이크로비드 사이에 형광 나노입자가 비특이적으로 포획되는 것을 방지하기 위함이다. (iv) 다음으로 포름아마이드 용액 주입을 통하여 스트렙타비딘 단백질이 변형되어 스트렙타비딘 - 펩타이드(LHPQF) 반응이 끊어지도록 유도하고, 칩에 15 kPa의 높은 압력을 1초 주기로 가하여 마이크로비드들을 강하게 흔들어 줌으로써 비드의 표면에 존재하는 나노입자들을 분리한다. (v) 최종적으로 분리된 나노입자들을 포함하는 용액 20 μl 을 모두 나노슬릿 칩에 주입하여 형광 현미경을 통해 형광신호를 검출한다.

실험에 사용된 마이크로비드는 지름이 30 μm 크기인 Tentagel

비드로써 (0.23 mmol/g) Rapp Polymere에서 구입하였다. 마이크로 비드의 표면에는 스트렙타비딘 단백질과 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드 서열 Leucine(L) - Histidine(H) - Proline(P) - Glutamine(Q) - Phenylalanine(F) (LHPQF)를 고체상 펩타이드 합성법을 이용하여 합성하였다. 스트렙타비딘이 코팅된 450nm 크기의 형광 나노입자는 spherotech사에서 구입하였다. 실험은 PBS (0.01 M, pH 7.0) 조건에서 진행하였으며, 스트렙타비딘 단백질과 펩타이드의 결합을 끊기 위해 사용되는 포름아마이드(formamide)용액은 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다. 형광 나노입자의 검출은 Olympus 광학현미경을 이용하였으며 Jenoptik사의 CCD카메라 (ProgRes C3)로 3초 동안 형광신호를 측정하였다.

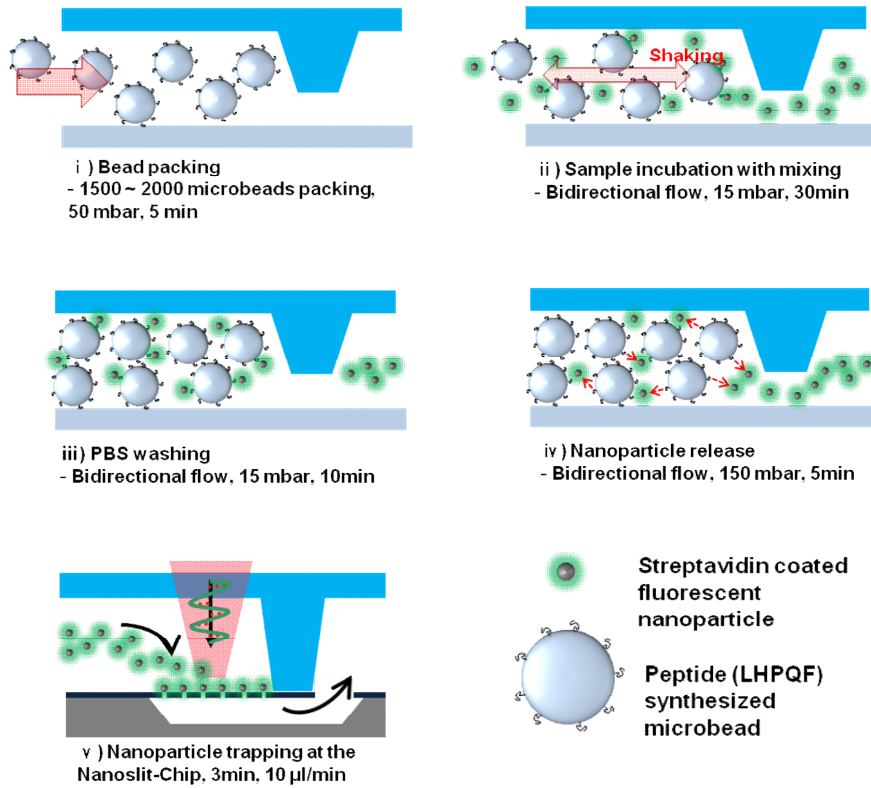


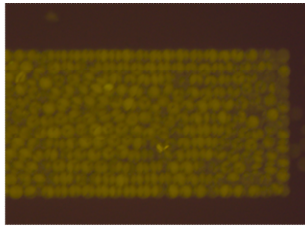
그림 5-12. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 실험 과정.

5.3.3 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템을 이용한 펩타이드

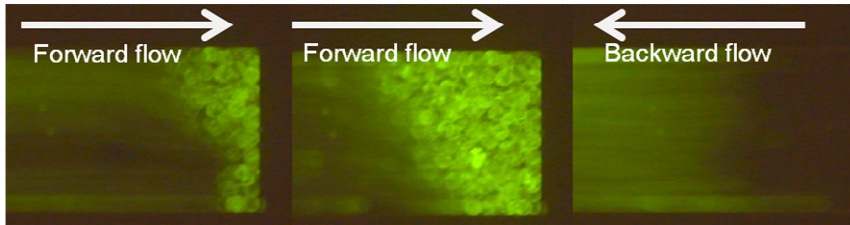
- 스트렙타비딘 어세이 결과

먼저, 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템이 성공적으로 작동하는 지를 검증하기 위해 10^8 /ml 농도의 스트렙타비딘 형광 나노입자를 검출하는 실험을 진행하였다. 마이크로비드 실험은 그림 5-12에서 설명한 실험 과정과 같이 진행하였으며, 실험의 각 과정마다 형광신호를 측정하여 그림 5-13에 나타내었다. 그림 5-13의 (i)은 마이크로비드 어세이 칩에 $30\ \mu\text{m}$ 크기의 마이크로비드를 충전하고 측정한 형광이미지이다. 마이크로비드는 성공적으로 충전이 되었으며, 비드 자체에서도 약한 형광신호가 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 실험 과정 (ii)는 마이크로비드가 충전된 유체채널에 형광 나노입자를 주입하여 반응시키는 과정에 형광이미지를 획득한 것이다. 그림 5-13의 (ii)에서 보는 것과 같이 마이크로비드가 좌, 우로 쉼이면서 나노입자들과 반응하는 것을 볼 수 있었으며, 펩타이드 - 스트렙타비딘 결합에 의해서 마이크로비드의 표면에 형광 나노입자가 결합하여 형광신호가 크게 증가하는 것을 볼 수 있다. 실험 과정 (iii)은 PBS용액을 이용하여 10분 동안 마이크로비드 유체채널을 세척(washing) 한 이후의 형광이미지이다. 세척 후에도 많은 수의 형광 나노입자가 마이크로비드와 결합하여 강한 형광신호가 발생하는 것을 볼 수 있다. 실험 과정 (iv)는 결합된 나노입자들을 마이크로비드로부터 분리시키는 과정이다. 나노입자를 마이크로비드의 표면에서 분리해 내기 위해서 스트렙타비딘을 변성시키는 포름아마이드(formamide) 용액을 유체 채널에 주입하고, 15kPa의 압력을 1초 주기로 마이크로비드에 가해주어 비드들이 연속적으로 유체채널의 벽과 부딪치도록 하였다. 그 결과

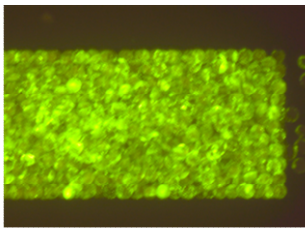
그림5-13의 (iv)와 같이 대부분의 형광 나노입자가 분리되는 것을 확인 할 수 있었다. 실험 과정 (v)에서는 실험 과정 (iv)에서 얻은 20 μ l 의 용액의 나노입자를 나노슬릿 칩에 주입하였다. 20 μ l의 샘플 용액을 모두 나노슬릿에 주입한 후 형광을 측정하면 그림 5-13의 (v)와 같이 나노슬릿 영역에 나노입자들이 포획되어 농축되는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 실험 결과 통해 본 연구에서 개발한 시스템이 나노입자를 바이오 어세이를 통해서 선택적으로 포획하고, 포획된 나노입자를 분리하여 나노슬릿 칩의 검출 영역에 농축함으로써 나노슬릿 칩 기반 검출이 가능하다는 것을 증명할 수 있었다.



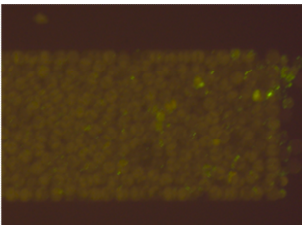
i) Bead packing



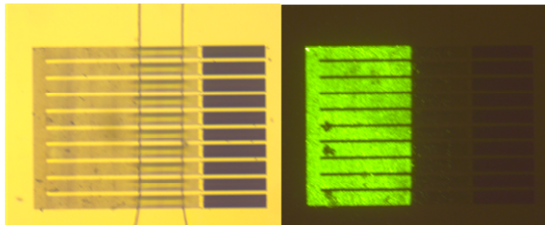
ii) Peptide-streptavidin assay: Bidirectional flow for mixing



iii) After washing



iv) Nanoparticle release



v) Nanoparticle trapping at the Nanoslit-Chip

그림 5-13. 펩타이드-스트렙타비딘 어세이 과정 (형광이미지).

본 연구에서 개발한 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템은 일반적인 마이크로비드 어세이 칩이 가지는 검출의 문제점을 개선하여 검출의 민감도를 향상시키는 것이 목적이다. 따라서 개발된 나노슬릿 기반의 검출 시스템을 이용하여 마이크로비드 어세이 칩이 검출하기 힘든 저농도의 나노입자를 검출하는 실험을 진행하는 것이 바람직하다. 이를 위해, test tube에서는 검출이 잘 안되는 저농도 영역인 $1.25 \times 10^6/\text{ml}$ 에서 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 농도의 형광 나노입자를 검출하는 실험을 진행하였다. 또한 마이크로비드의 표면에 결합되어서 최종적으로 나노슬릿 칩에서 포획되는 나노입자들이 펩타이드 - 스트렙타비딘 특이적 결합(specific binding)에 의해서 검출된 것인지를 확인하기 위한 대조군 실험도 같이 진행하였다. 대조군 실험은 기초 실험 때와 같이 표면에 펩타이드 서열이 없고 아민기(amine)만 존재하는 마이크로비드를 이용하였다.

그림 5-14은 $1.25 \times 10^6/\text{ml}$, $2.5 \times 10^6/\text{ml}$, $5 \times 10^6/\text{ml}$, $1 \times 10^7/\text{ml}$ 농도의 스트렙타비딘 형광 나노입자가 포함된 샘플용액 20 μl 를 마이크로비드 어세이 칩에서 검출한 결과이다. 그림 5-14의 (a)는 마이크로비드 어세이 칩에서 나노입자의 농도에 따른 어세이와 대조군 실험의 결과이다. 마이크로비드 영역의 형광 신호가 나노입자의 농도에 따라 증가하는 것을 이미지로 확인할 수 있었고, 대조군 실험의 경우 형광 신호가 매우 낮게 나오는 것을 확인 할 수 있었다. 획득한 형광 이미지는 National Instrument사의 Vision Assistant 프로그램을 이용하여 형광신호를 정량화하였다. 그림 5-14의 (b)는 펩타이드 - 스트렙타비딘 어세이의 결과를 이미지 프로세스를 통해 정량화하여 나타낸 것이다. 나노입자의 농도가 증가함에 따라서 마이크로비드에서 검출되는 형광 신호가 증가하는 것을 확인 할 수 있다. 반면 대조군 실험의 결과는 그림 5-14의 (c)와 같이 나노입자의 형광신호가 매우

낮은 수준이었고, 형광 나노입자의 농도에 따른 경향성도 확인할 수 없었다. 따라서 마이크로비드 어세이 칩에서 스트렙타비딘 형광 나노입자는 마이크로비드의 펩타이드 LHPQF와 매우 특이적으로 결합한다고 평가할 수 있다. 하지만 주입된 나노입자의 농도가 낮기 때문에, 형광 나노입자의 농도에 따른 형광신호의 증가량이 크지 않고 표준편차가 커서 검출의 신뢰도가 좋지 않았다. 특히, $5 \times 10^6/\text{ml}$ 이하의 형광 나노입자 샘플에서는 형광 신호의 증가량이 매우 작아 마이크로비드 어세이 칩에서는 검출할 수 없는 저 농도 영역임을 알 수 있었다.

• Fluorescent signal on microbead column

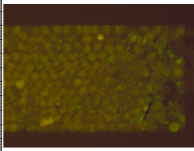
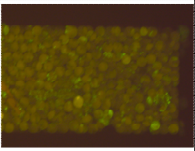
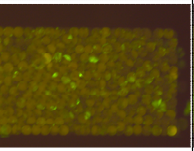
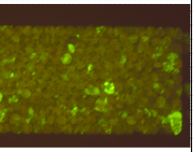
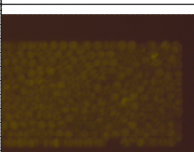
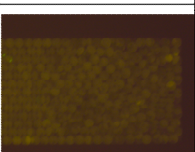
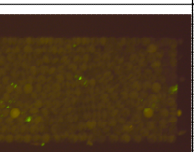
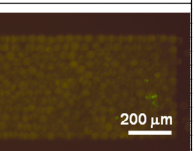
Target NP concentration	1.25×10^6	2.5×10^6	5×10^6	10^7
peptide – streptavidin binding				
non-specific binding				

그림 5-14. 마이크로비드 어세이칩의 실험 결과.

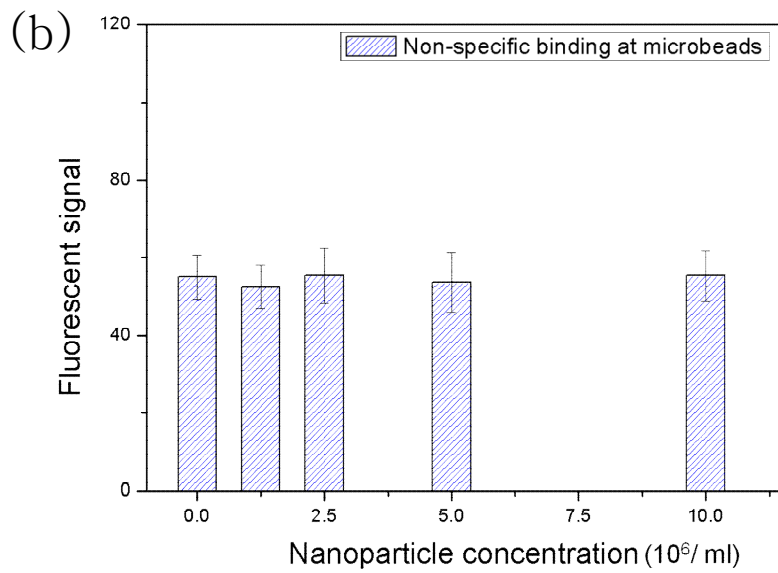
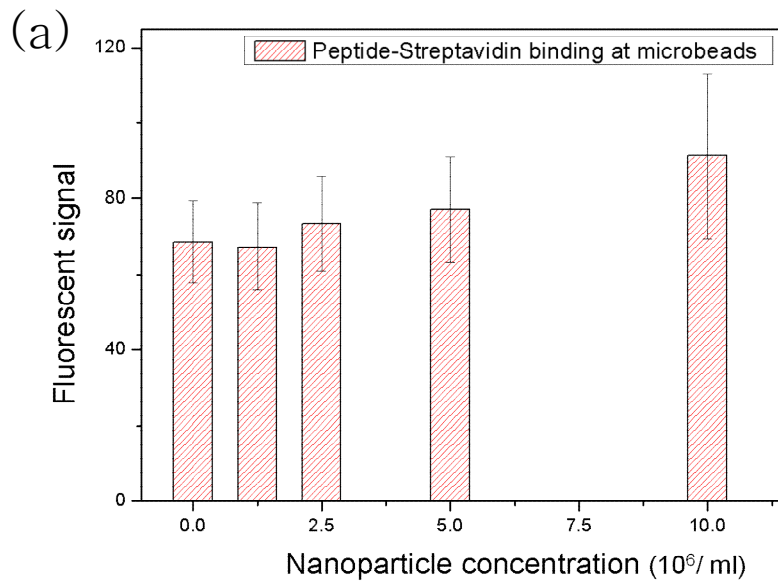
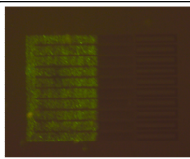
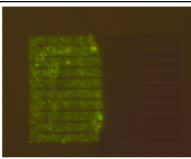
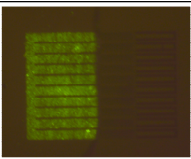
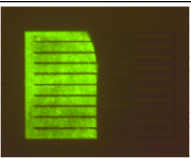
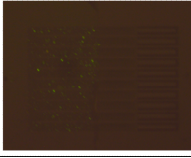
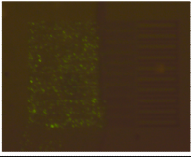
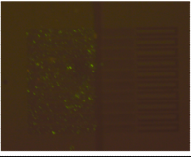
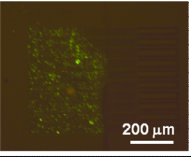


그림 5-15. 마이크로비드 어세이 칩의 결과 그래프: (a)어세이 실험 (b)대조군 실험.

그림 5-15는 $1.25 \times 10^6/\text{ml} \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$ 농도의 나노입자 샘플을 마이크로비드 어세이 칩에서 검출한 후에, 검출된 나노입자들을 마이크로비드의 표면에서 분리시켜서 나노슬릿 칩에 주입한 결과이다. 그림 5-15는 실험군과 대조군에 대한 각 농도별 검출 결과 이미지를 나타낸 것이다. 나노입자의 검출 결과를 정량화하기 위해서 NI Vision Assistant 프로그램을 이용하여 나노슬릿 영역의 $300 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ 의 형광신호 평균과 표준편차를 구하여서 그림 5-16의 (a)와 (b)에 나타내었다. 그림 5-16의 (a)은 펩타이드 - 스트렙타비딘 반응에 의한 특이적 결합의 결과이다. 그래프에 나타난 것과 같이 나노입자의 농도가 증가함에 따라 나노슬릿에서 검출되는 형광 신호가 비례해서 증가하는 것을 확인 할 수 있었고, 농도에 따른 신호의 증가량이 마이크로비드 어세이 칩의 경우에 비해서 매우 크다는 것을 확인 할 수 있다. 또한, 마이크로 비드 어세이 칩에서 검출이 안되는 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 이하의 농도에서도 나노입자가 검출되는 것을 확인 할 수 있었다. 대조군 실험의 결과는 그림 5-16의 (b)과 같이 비특이적 반응에 의해 검출되는 형광신호가 크지 않았고, 농도별 경향성도 없었다.

• Fluorescent signal on nanoslit membrane

Target NP concentration	1.25×10^6	2.5×10^6	5×10^6	10^7
peptide – streptaivdin binding				
non-specific binding				

• SEM image of the nanoslit membrane

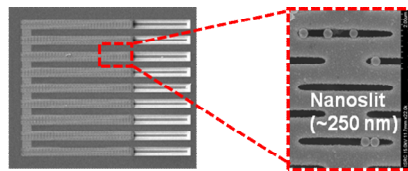


그림 5-16. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 실험 결과.

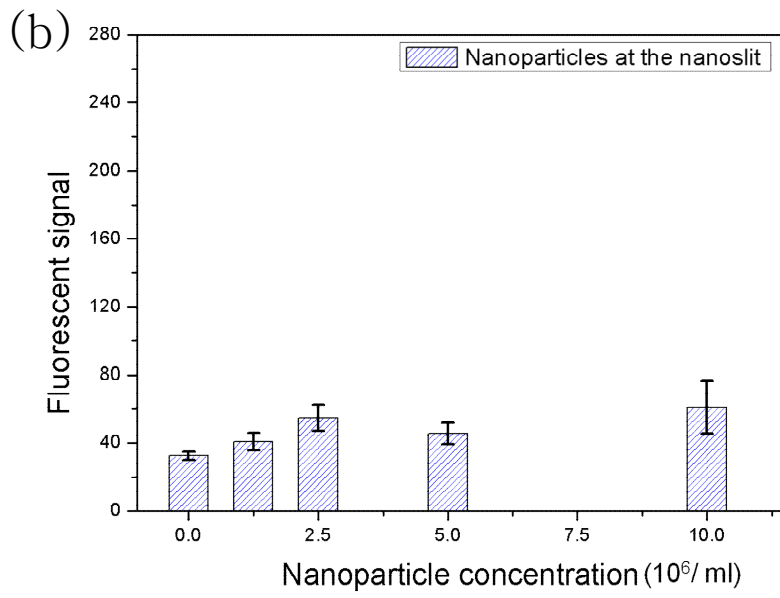
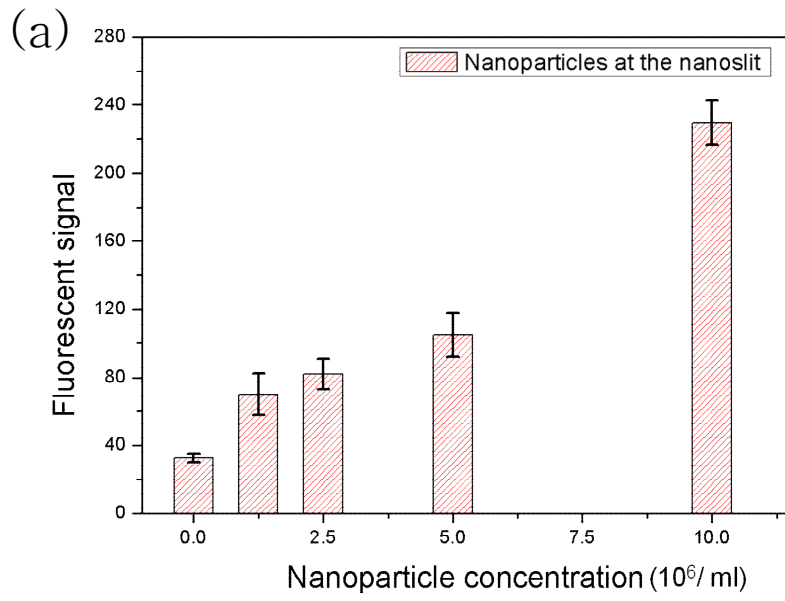


그림 5-17. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 결과 그래프: (a)어세이 실험
(b)대조군 실험.

마지막으로 마이크로비드 어세이 칩에서 검출되는 형광 신호와 나노슬릿 칩에서 검출되는 형광 신호를 비교하여 그림 5-18에 나타내었다. 형광 신호를 비교하기 위해, 각 칩에서 검출된 형광 신호를 정규화(normalize)하였다. 형광 신호의 정규화는 마이크로비드 어세이 칩의 경우에는 유체 채널에 마이크로 비드가 충전되었을 때의 형광 신호를 초기값으로 하였고, 나노슬릿 칩의 경우에는 나노슬릿 칩에 PBS 버퍼 용액만 주입되었을 때의 형광 신호를 초기값으로 하였다. 그림 5-18를 비교해보면, 마이크로비드 어세이 칩에서 검출이 되지 않거나, 검출 신호가 미미한 저농도($1.25 \times 10^6/\text{ml} \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$)의 형광 나노입자의 경우에도 나노슬릿 칩을 이용하여 형광 나노입자를 농축하면 매우 민감하게 검출이 가능하다는 것을 알 수 있다. 따라서 형광신호 세기의 관점에서 비교해보면, 본 시스템은 마이크로 비드 어세이의 검출 한계를 10배 이상 증가시킬 수 있는 것으로 생각된다.

나노슬릿 칩을 기반으로 형광 나노입자를 검출하는 방법이 검출 한계를 향상시키는 이유는 두 가지 요인이 있다고 생각된다. 첫 번째 요인은 형광 나노입자의 농축 효과이다. 마이크로비드 어세이 칩에 $30 \mu\text{m}$ 마이크로 비드를 2000 개 충전시킬 경우 마이크로 비드가 충전 된 영역의 넓이는 약 2 mm^2 이고, 나노슬릿 칩의 검출 영역의 넓이는 0.15 mm^2 이어서 검출 영역이 약 13.33배 농축되는 효과가 있다. 즉 마이크로비드에서의 형광 신호의 세기가 미미한 저농도 샘플의 경우에도, 비드의 표면에 분산되어있는 나노입자들을 나노슬릿의 검출 영역에 포획하면 농축효과에 의해 정량적인 신호를 검출할 가능성이 있다는 것이다. 또한 마이크로비드 어세이 칩에 충전하는 마이크로비드의 개수를 증가시키면, 나노입자의 농축효과가 증가하여 검출한계가 더욱 향상될 수도 있을 것이다. 검출한계가 향상된 두 번째 요인은 배경형광신호의 감소이다. 마이크로비드만 유체채널에 충전된 경우의

형광이미지에서도 확인 할 수 있듯이 마이크로비드는 자체적으로 형광신호를 발생시킨다. 반면, 나노슬릿 칩의 경우에는 금속인 Cr/Au가 증착되어 있어 배경형광신호가 매우 낮다. 따라서 나노슬릿 칩 기반의 검출은 마이크로 비드 어세이 칩에 비해 배경 노이즈가 낮아 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio)가 증가되는 효과가 있다.

위와 같은 실험 결과들을 토대로 결론을 내린다면, 나노슬릿 칩 기반의 검출 시스템은 형광 나노입자의 농축효과와 나노슬릿 칩의 배경형광신호 감소효과에 의해 펩타이드-스트렙타비딘 어세이의 검출 한계를 10배 이상 증가시킬 수 있다고 생각된다.

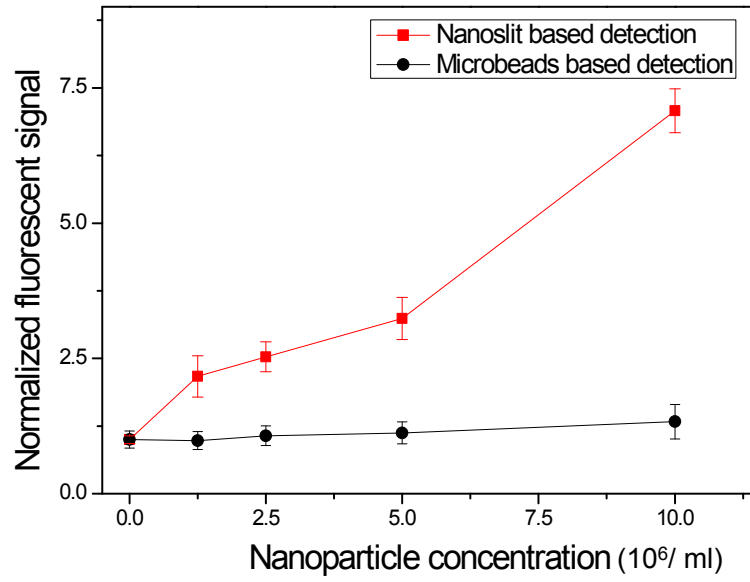


그림 5-18. 마이크로비드 어세이 칩과 나노슬릿 칩의 어세이 결과 비교.

5.4 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 이용한 펩타이드 서열의 스트렙타비딘 단백질 친화력 검사

개발된 나노슬릿 칩 기반 검출시스템의 실제적인 바이오 어세이 (bio-assay) 응용으로 펩타이드 서열 후보군들에 대한 스트렙타비딘 단백질의 친화력을 검사하는 실험을 진행하였다. 펩타이드 서열의 친화력 검사(affinity test)는 특정 단백질과 결합하는 최적의 펩타이드 서열을 결정하기 위한 실험으로, 신약 및 리간드 물질 개발에 광범위하게 사용될 수 있다 [62, 63]. 따라서 펩타이드 서열들의 목표 단백질에 대한 친화력을 정밀하게 조사해야 하며, 이를 위해서는 펩타이드와 목표 단백질의 결합력을 정량적으로 분석할 수 있어야 한다. 본 논문에서 제안하는 검출시스템은 펩타이드 - 스트렙타비딘 결합에 의해 검출된 나노입자를 매우 정량적으로 분석 할 수 있어 친화력 검사에 적합하다.

친화력 검사를 수행할 펩타이드 서열로는 펩타이드 LHPQF, FHPQG, IHPQG를 선정하였다. LHPQF는 스트렙타비딘 단백질과 특이적으로 결합하는 잘 알려진 펩타이드 서열이다 [63]. LHPQF서열 중 HPQ는 스트렙타비딘 단백질과 결합하는 부분으로 알려져 있고, Phenylalanine (F), Isoleucine (I), Glycine (G)와 같은 소수성 아미노산들이 펩타이드와 스트렙타비딘의 결합을 도와주는 것으로 추정된다. 따라서 펩타이드 서열의 main part인 HPQ는 고정하고, 양쪽 끝 단의 서열을 F, I, G로 바꾸면서 친화력이 어떻게 변하는지를 검사하도록 하였다. 펩타이드 서열의 친화력은 LHPQF가 가장 강할 것으로 예상되며, 다음으로는 아미노산 F의 위치가 바뀐 FHPQG, 그리고 가장 약한 서열은 아미노산 F가 없는 IHPQG로 예상된다.

전체 실험 과정 및 조건은 5.3절의 실험 내용과 동일하게 진행하였다. 실험에 사용된 스트렙타비딘 형광 나노입자는 $10^7/\text{ml}$ 의 농도로 20 μl 주입하였고, 3종류의 펩타이드에 대해서 한번씩 실험을 수행하여 결과를 정리하였다. 먼저 마이크로비드 어세이 칩에서의 펩타이드 - 스트렙타비딘 어세이 결과를 그림 5-19와 5-20에 정리하였다. 먼저 주목해야 할 것은, 충전된 마이크로비드들의 배경형광신호가 모두 다르다는 점이다. 이는 펩타이드 합성 과정에서 사용되는 화학물질들에 의해서 마이크로비드의 배경형광신호가 다르게 결정되는 것으로 생각된다. 또한 펩타이드 FHPQG와 IHPQG의 경우에는 어세이 후의 형광신호가 초기값보다 낮아진 것을 확인할 수 있다. 이는 마이크로비드들의 충전상태나 버퍼용액의 조성이 마이크로비드의 배경형광신호에 영향을 주어 전체적인 신호가 변한 것으로 생각된다. 결론적으로 마이크로비드 어세이 칩에서는 펩타이드와 스트렙타비딘의 친화력을 정량적으로 분석하기가 어려우며, 나노슬릿 칩과 같이 배경형광신호의 영향을 제거하거나 줄일 수 있는 검출플랫폼을 사용하는 것이 바람직하다.

• Microbead based detection

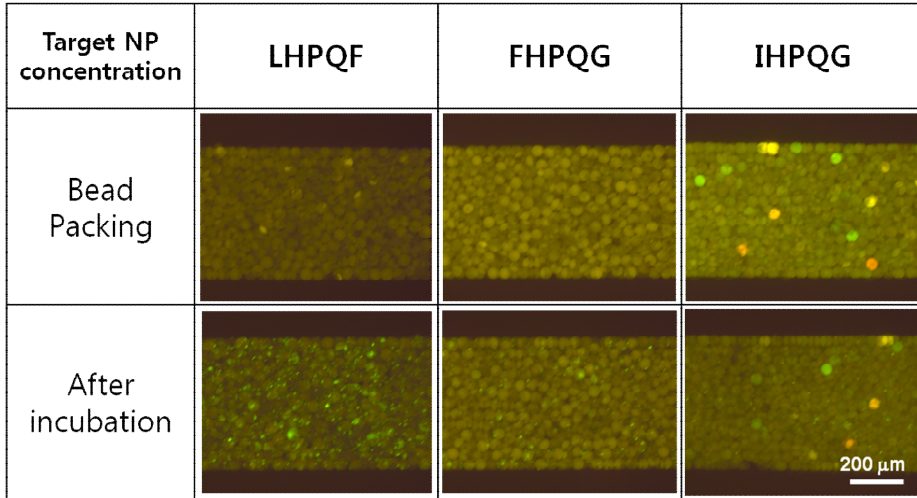


그림 5-19. 마이크로비드 어세이 칩에서의 친화력 검사 실험 결과.

• Microbead based detection

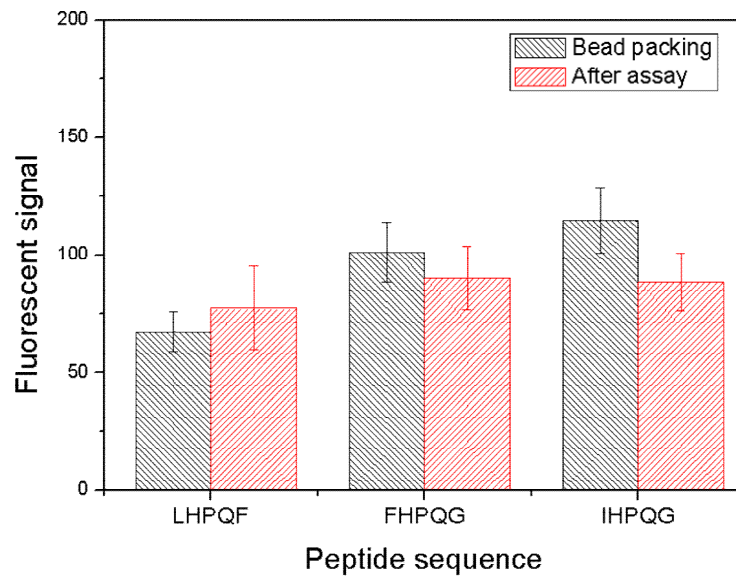


그림 5-20. 마이크로비드 어세이 칩에서의 친화력 검사 결과 그래프.

그림 5-21과 5-22는 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 이용한 펩타이드 서열 LHPQF, FHPQG, IHPQG에 대한 스트렙타비딘과의 어세이 결과이다. 예상대로 LHPQF에서 가장 많은 나노입자들이 검출되었고, FHPQG에서는 중간 정도의 결합력을 가지는 것으로 나타났다. 마지막으로 IHPQG와 같은 경우 상대적으로 매우 낮은 신호를 얻을 수 있었는데, 이는 아미노산 F가 없는 것이 펩타이드의 결합력을 약화시킨 것으로 추정된다. 따라서 스트렙타비딘과 특이적으로 결합하는 펩타이드 서열은 HPQ와 F서열이 들어가는 것이 바람직하며, HPQ와 F를 고정한 상태에서 다른 아미노산들을 도입하여 친화력 검사를 수행하면 최적의 펩타이드 서열을 찾을 수 있을 것을 생각된다. 위의 실험 결과들을 토대로 볼 때, 나노슬릿 칩 기반 검출시스템은 어세이 결과를 민감하고, 정량적으로 분석할 수 있는 플랫폼으로 생각된다.

• Nanoslit based detection

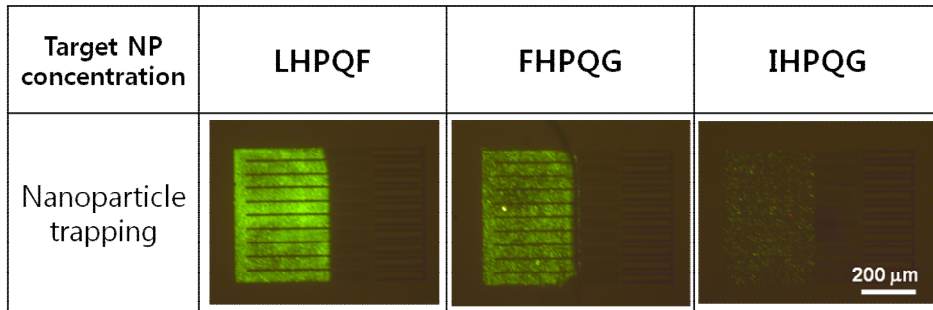


그림 5-21. 나노슬릿 칩에서의 친화력 검사 실험 결과.

• Nanoslit based detection

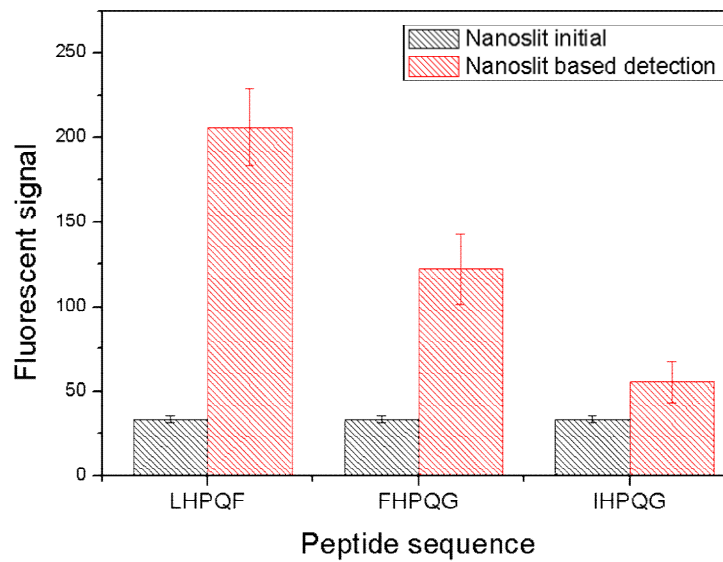


그림 5-22. 나노슬릿 칩에서의 친화력 검사 실험 결과 그래프.

5.5 요약 및 검토

본 장에서는 마이크로 비드를 이용한 어세이 칩의 검출한계를 향상시키기 위한 검출 플랫폼으로 나노슬릿 칩 기반의 검출 시스템을 연구하였다. 나노슬릿 칩 기반 검출시스템은 마이크로비드 어세이 칩과 나노슬릿 칩으로 구성되어 있다. 마이크로비드 어세이 칩은 2000여 개의 마이크로 비드를 충전 할 수 있는 유체 채널이 있어 마이크로비드 기반의 어세이가 가능하도록 하였고, 나노슬릿 칩은 250 nm 선폭의 나노슬릿 칩을 이용하였다. 전체 유체 시스템은 마이크로비드 어세이 칩과 나노슬릿 칩을 튜브로 연결하고, 압력 기반 펌프의 유체제어를 통해 마이크로비드 어세이 칩에서 검출한 형광 나노입자들을 나노슬릿 칩에서 농축하여 검출할 수 있도록 구성하였다.

개발된 시스템의 검출 성능을 평가하기 위해 펩타이드 - 스트렙타비딘 반응을 이용한 모델링 어세이를 수행하였다. 펩타이드 LHPQF 서열이 합성된 마이크로 비드가 스트렙타비딘이 코팅된 형광 나노입자를 검출하는 실험을 진행하였고, 검출된 나노입자의 형광신호는 형광 현미경을 이용하여 측정하고, 이미지 프로세스를 통해서 신호를 정량화하였다. $1.25 \times 10^6/\text{ml} \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$ 농도의 스트렙타비딘이 코팅된 형광 나노입자를 검출하는 실험을 진행하였고, 마이크로 비드 어세이 칩의 경우에는 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 의 형광 나노입자 농도에서도 정량화된 형광 신호가 1.33로 매우 약하였다. 반면 나노슬릿 칩 기반의 검출은 $1.25 \times 10^6/\text{ml}$ 의 저농도에서도 정량화 된 형광 신호가 2.17로 성공적으로 나노입자들이 검출되었다. 이러한 검출 결과의 향상은 나노슬릿 칩 기반의 검출이 가지는 나노입자 농축 효과와 나노슬릿 칩의 배경형광신호 감소효과에 기인한 것으로 추정할 수 있다. 마지막으로

나노슬릿 칩 기반 검출 시스템의 실제적인 응용으로, 스트렙타비딘 단백질에 대한 펩타이드 서열 후보군의 친화력 검사에 실험을 수행하였다. 3종류의 펩타이드 서열 LHPQF, FHPQG, IHPQG에 대한 스트렙타비딘 단백질의 친화도를 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 이용하여 수행하였으며, 마이크로비드 어세이 칩을 이용한 검사와 비교하여 볼 때, 정량적인 데이터를 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 나노슬릿 칩 기반의 검출 시스템의 성능을 객관적으로 증명하기 위해서 일반적으로 잘 알려진 강한 결합 중의 하나인 펩타이드 - 스트렙타비딘 반응을 검출하는 것을 목표로 하였다. 만약 마이크로 비드와 형광 나노입자에 항체를 고정화한다면 생체시료 내에 존재하는 단백질을 검출하는 면역학적 검출(immunoassay)에도 사용될 수 있으며, 저 농도의 목표 단백질을 민감하게 검출하여 검출 한계를 크게 높일 수 있을 것으로 기대된다.

제 6 장 결 론

본 연구는 나노입자를 농축하여 검출할 수 있는 나노구조를 가지 유체소자를 만들고 이를 마이크로비드 어세이에 연계함으로써 고민감도의 검출 시스템을 구현하는 것을 목적으로 진행하였다. 이를 위해 MEMS공정 기반을 이용하여 최소 200 nm 크기의 슬릿 패턴이 집적화된 나노유체소자를 설계하고 제작하였다. 제작된 소자는 다수의 나노슬릿 패턴이 존재하여 유체저항이 낮아 많은 양의 유체를 여과할 수 있으며, 액체 시료 속에 존재하는 소량의 나노입자도 검출 할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.

나노슬릿 칩의 크기에 따른 미세입자의 분리 및 포획 기능에 대해서 성능을 평가하기 위해서 1.8 μm , 450 nm 형광입자를 분리하여 포획하는 유체실험을 진행하였다. 비록 농도가 증가함에 따라서 크기에 따른 선택적인 분리 성능은 저하되지만, 저농도의 조건에서는 두 개의 미세입자들이 성공적으로 분리되며, 형광신호를 통해서 정량적으로 확인할 수 있었다. 또한, 나노슬릿 칩의 미세입자 분리기능을 응집반응검사에 이용하는 시도를 해보았다. 응집반응은 목표 단백질이 존재하면 나노입자들이 단백질을 매개체로하여 응집하게 되고 단백질-나노입자 복합체가 되어 크기가 커지게 된다. 크기가 커진 단백질-나노입자 복합체를 나노슬릿 칩에서 분리 및 포획하여 검출하는 실험을 진행하였고, 나노슬릿 칩은 검출한계가 10 pM, 검출범위가 10 pM에서 1 nM인 단백질 검출 성능을 보여주었다.

연구의 최종목표인 마이크로비드 어세이의 검출한계 향상을 위한 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템을 개발하였다. 먼저 기초실험으로써 실린지 튜브에서 펩타이드-스트렙타비딘 반응을 이용한 모델링실험을

진행하였다. 스트렙타비딘과 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드를 마이크로비드의 표면에 합성하고, 스트렙타비딘이 코팅된 형광나노입자와 반응시켜서 형광신호를 확인하는 것으로 실험과정을 설계하였다. 기초실험은 실린지튜브 상에서 마이크로비드와 형광나노입자를 반응시키고 난 후, 마이크로비드의 표면에 결합된 나노입자를 포름아미드와 vortexing machine을 이용하여 분리하여 나노슬릿 칩에 주입하는 실험을 진행하였다. 그 결과 형광나노입자가 마이크로비드의 표면에서 분리되어 나노슬릿 칩에 농축되는 것을 확인할 수 있었고, $1.25 \times 10^7/\text{mL}$ 에서 $10^8/\text{mL}$ 의 형광나노입자 농도에서 나노슬릿의 형광신호가 나노입자의 농도에 비례한다는 것을 확인하였다. 다음으로 나노슬릿 칩 기반의 검출시스템을 구성하여, 기존의 실린지튜브상에서 검출이 힘든 $10^7/\text{mL}$ 이하의 저농도에서 형광나노입자를 검출하는 실험을 진행하였다. 실험 결과 마이크로비드 어세이 칩에서는 형광신호가 매우 작지만, 이를 농축하여 나노슬릿에 주입한 결과는 형광나노입자의 농도에 비례하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 저농도의 형광나노입자 조건에서 마이크로비드의 표면에 결합한 소량의 형광나노입자들이 나노슬릿칩에 농축되면서 정량적인 형광신호를 나타낸 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 제안하는 나노슬릿 칩 기반의 검출 시스템은 마이크로비드 어세이의 검출 한계를 향상시키는 효과적인 방안이 될 수 있음이 증명되었다.

마지막으로 개발된 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템의 실제적인 응용으로, 스트렙타비딘 단백질에 대한 펩타이드 서열 후보군의 친화력 검사에 실험을 수행하였다. 3종류의 펩타이드 서열 LHPQF, FHPQG, IHPQG에 대한 스트렙타비딘 단백질의 친화도를 나노슬릿 칩 기반 검출시스템을 이용하여 수행하였으며, 마이크로비드 어세이 칩을 이용한 검사와 비교하여 볼 때, 매우 정량적인 데이터를 얻을 수 있었다.

따라서 나노슬릿 칩 기반 검출 시스템은 마이크로비드 어세이 뿐만 아니라, 펩타이드 서열들의 친화력을 정밀하게 조사하기 위한 플랫폼으로 효율적으로 사용될 수 있음을 보였다.

참고 문헌

- [1] N. T. Nguyen and Z. G. Wu, "Micromixers - a review," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 15, no. 2, pp. R1-R16, Feb 2005.
- [2] K. W. Oh and C. H. Ahn, "A review of microvalves," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, no. 1, pp. R13-R39, May 2006.
- [3] J. Nilsson, M. Evander, B. Hammarstrom, and T. Laurell, "Review of cell and particle trapping in microfluidic systems," *Analytica Chimica Acta*, vol. 649, no. 2, pp. 141-157, Sep 7 2009.
- [4] Y. H. Zhang and P. Ozdemir, "Microfluidic DNA amplification-A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 638, no. 2, pp. 115-125, Apr 13 2009.
- [5] H. Hwang, H. Chon, J. Choo, and J. K. Park, "Optoelectrofluidic Sandwich Immunoassays for Detection of Human Tumor Marker Using Surface-Enhanced Raman Scattering," *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 18, pp. 7603-7610, Sep 15 2010.
- [6] J. Park, V. Sunkara, T. H. Kim, H. Hwang, and Y. K. Cho, "Lab-on-a-Disc for Fully Integrated Multiplex Immunoassays," *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 10, pp. 4634-4634, May 15 2012.
- [7] P. R. Srinivas, M. Verma, Y. M. Zhao, and S. Srivastava, "Proteomics for cancer biomarker discovery," *Clinical Chemistry*, vol. 48, no.8, pp. 1160-1169, Aug 2002.
- [8] Y. S. Huh, A. J. Chung, B. Cordovez, and D. Erickson, "Enhanced on-chip SERS based biomolecular detection using electrokinetically active microwells," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 3, pp. 433-439, 2009.

- [9] T. S. Sim, E. M. Kim, H. S. Joo, B. G. Kim, and Y. K. Kim, "Application of a temperature-controllable microreactor to simple and rapid protein identification using MALDI-TOF MS," *Lab on a Chip*, vol. 6, no. 8, pp. 1056-1061, 2006.
- [10] A. J. deMello, "Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 394-402, Jul 27 2006.
- [11] P. M. Valencia, O. C. Farokhzad, R. Karnik, and R. Langer, "Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles," *Nature Nanotechnology*, vol. 7, no. 10, pp. 623-629, Oct 2012.
- [12] X. J. Feng, W. Du, Q. M. Luo, and B. F. Liu, "Microfluidic chip: Next-generation platform for systems biology," *Analytica Chimica Acta*, vol. 650, no. 1, pp. 83-97, Sep 14 2009.
- [13] M. Hu, J. Yan, Y. He, H. T. Lu, L. X. Weng, S. P. Song, C. H. Fan, and L. H. Wang, "Ultrasensitive, Multiplexed Detection of Cancer Biomarkers Directly in Serum by Using a Quantum Dot-Based Microfluidic Protein Chip," *Acs Nano*, vol. 4, no. 1, pp. 488-494, Jan 2010.
- [14] D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H. Y. Park, J. Driskell, and M. D. Porter, "Femtomolar detection of prostate-specific antigen: An immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels," *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 21, pp. 5936-5943, Nov 1 2003.
- [15] Z. F. Fu, F. Yan, H. Liu, Z. J. Yang, and H. X. Ju, "Channel-resolved multianalyte immunosensing system for flow-through chemiluminescent detection of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 23, no.

7, pp. 1063–1069, Feb 28 2008.

- [16] M. Hu, Y. He, S. P. Song, J. A. Yan, H. T. Lu, L. X. Weng, L. H. Wang, and C. H. Fan, "DNA-bridged bioconjugation of fluorescent quantum dots for highly sensitive microfluidic protein chips," *Chemical Communications*, vol. 46, no. 33, pp. 6126–6128, 2010.
- [17] M. Lee, K. Lee, K. H. Kim, K. W. Oh, and J. Choo, "SERS-based immunoassay using a gold array-embedded gradient microfluidic chip," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 19, pp. 3720–3727, 2012.
- [18] Y. Koh, B. R. Lee, H. J. Yoon, Y. H. Jang, Y. S. Lee, Y. K. Kim, and B. G. Kim, "Bead affinity chromatography in a temperature-controllable microsystem for biomarker detection," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 404, no. 8, pp. 2267–2275, Nov 2012.
- [19] 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," *Analytical Chemistry*, vol. 73, no. 6, pp. 1213–1218, Mar 15 2001.
- [20] S. I. Han, K. H. Han, A. B. Frazier, J. P. Ferrance, and J. P. Landers, "An automated micro-solid phase extraction device involving integrated high-pressure microvalves for genetic sample preparation," *Biomedical Microdevices*, vol. 11, no. 4, pp. 935–942, Aug 2009.
- [21] Z. Dai, J. Chen, F. Yan, and H. X. Ju, "Electrochemical sensor for immunoassay of carcinoembryonic antigen based on thionine monolayer modified gold electrode," *Cancer Detection and Prevention*, vol. 29, no. 3, pp. 233–240, 2005.
- [22] R. E. Wang, Y. Zhang, J. Cai, W. Cai, and T. Gao, "Aptamer-Based Fluorescent Biosensors," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 27, pp. 4175–4184, Sep 2011.

- [23] K. Sato, M. Yamanaka, H. Takahashi, M. Tokeshi, H. Kimura, and T. Kitamori, "Microchip-based immunoassay system with branching multichannels for simultaneous determination of interferon-gamma," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 5, pp. 734-739, Mar 2002.
- [24] A. Nagy and A. Gaspar, "Packed multi-channels for parallel chromatographic separations in microchips," *Journal of Chromatography A*, vol. 1304, pp. 251-256, Aug 23 2013.
- [25] H. Andersson, W. van der Wijngaart, P. Enoksson, and G. Stemme, "Micromachined flow-through filter-chamber for chemical reactions on beads," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 67, no. 1-2, pp. 203-208, Aug 10 2000.
- [26] A. R. Wheeler, H. Moon, C. A. Bird, R. R. O. Loo, C. J. Kim, J. A. Loo, and R. L. Garrell, "Digital microfluidics with in-line sample purification for proteomics analyses with MALDI-MS," *Analytical Chemistry*, vol. 77, no. 2, pp. 534-540, Jan 15 2005.
- [27] N. Lion, J. O. Gellon, H. Jensen, and H. H. Girault, "On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1003, no. 1-2, pp. 11-19, Jun 27 2003.
- [28] S. Ekstrom, J. Malmstrom, L. Wallman, M. Lofgren, J. Nilsson, T. Laurell, and G. Marko-Varga, "On-chip microextraction for proteomic sample preparation of in-gel digests," *Proteomics*, vol. 2, no. 4, pp. 413-421, Apr 2002.
- [29] Y. H. Tennico, D. Hutanu, M. T. Koesdjojo, C. M. Bartel, and V. T. Remcho, "On-Chip Aptamer-Based Sandwich Assay for Thrombin Detection Employing Magnetic Beads and Quantum Dots," *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 13, pp. 5591-5597, Jul 1 2010.
- [30] J. V. Jokerst, A. Raamanathan, N. Christodoulides, P. N. Floriano, A.

- A. Pollard, G. W. Simmons, J. Wong, C. Gage, W. B. Furmaga, S. W. Redding, and J. T. McDevitt, "Nano-bio-chips for high performance multiplexed protein detection: Determinations of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dot bioconjugate labels," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 24, no. 12, pp. 3622–3629, Aug 15 2009.
- [31] W. J. Chung, M. S. Kim, S. Cho, S. S. Park, J. H. Kim, Y. K. Kim, B. G. Kim, and Y. S. Lee, "Microaffinity purification of proteins based on photolytic elution: Toward an efficient microbead affinity chromatography on a chip," *Electrophoresis*, vol. 26, no. 3, pp. 694–702, Feb 2005.
- [32] T. Nguyen, R. Pei, M. Stojanovic, and Q. Lin, "An aptamer-based microfluidic device for thermally controlled affinity extraction," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 6, no. 4, pp. 479–487, Apr 2009.
- [33] J. M. Klostranec, Q. Xiang, G. A. Farcas, J. A. Lee, A. Rhee, E. I. Lafferty, S. D. Perrault, K. C. Kain, and W. C. W. Chan, "Convergence of quantum dot barcodes with microfluidics and signal processing for multiplexed high-throughput infectious disease diagnostics," *Nano Letters*, vol. 7, no. 9, pp. 2812–2818, Sep 2007.
- [34] C. H. Duan, W. Wang, and Q. Xie, "Review article: Fabrication of nanofluidic devices," *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 2, Mar 2013.
- [35] R. Chantiwas, S. Park, S. A. Soper, B. C. Kim, S. Takayama, V. Sunkara, H. Hwang, and Y. K. Cho, "Flexible fabrication and applications of polymer nanochannels and nanoslits," *Chemical Society Reviews*, vol. 40, no. 7, pp. 3677–3702, 2011.
- [36] E. Tamaki, A. Hibara, H. B. Kim, M. Tokeshi, and T. Kitamori, "Pressure-driven flow control system for nanofluidic chemical process," *Journal of Chromatography A*, vol. 1137, no. 2, pp. 256–

262, Dec 29 2006.

- [37] I. Choi, Y. S. Huh, and D. Erickson, "Size-selective concentration and label-free characterization of protein aggregates using a Raman active nanofluidic device," *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 4, pp. 632–638, 2011.
- [38] M. Wang, N. Jing, I. H. Chou, G. L. Cote, and J. Kameoka, "An optofluidic device for surface enhanced Raman spectroscopy," *Lab on a Chip*, vol. 7, pp. 630–632, 2007.
- [39] M. Wang, M. Benford, N. Jing, G. Cote, and J. Kameoka, "Optofluidic device for ultra-sensitive detection of proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 6, no. 5, pp. 411–417, Mar 2009.
- [40] L. D. Menard and J. M. Ramsey, "Fabrication of Sub-5 nm Nanochannels in Insulating Substrates Using Focused Ion Beam Milling," *Nano Letters*, vol. 11, no. 2, pp. 512–517, Feb 2011.
- [41] L. H. Thamdrup, A. Klukowska, and A. Kristensen, "Stretching DNA in polymer nanochannels fabricated by thermal imprint in PMMA," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 12, Mar 26 2008.
- [42] P. Sivanesan, K. Okamoto, D. English, C. S. Lee, and D. L. DeVoe, "Polymer nanochannels fabricated by thermomechanical deformation for single-molecule analysis," *Analytical Chemistry*, vol. 77, no. 7, pp. 2252–2258, Apr 1 2005.
- [43] S. M. Park, Y. S. Huh, H. G. Craighead, and D. Erickson, "A method for nanofluidic device prototyping using elastomeric collapse," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 37, pp. 15549–15554, Sep 15 2009.
- [44] S. Y. Yang, I. Ryu, H. Y. Kim, J. K. Kim, S. K. Jang, and T. P. Russell, "Nanoporous membranes with ultrahigh selectivity and flux for the

- filtration of viruses," *Advanced Materials*, vol. 18, no. 6, pp. 709-+, Mar 17 2006.
- [45] Y. Kim, M. Cha, Y. Choi, H. Joo, and J. Lee, "Electrokinetic separation of biomolecules through multiple nano-pores on membrane," *Chemical Physics Letters*, vol. 561, pp. 63-67, Mar 13 2013.
- [46] A. de la Escosura-Muniz and A. Merkoci, "A Nanochannel/Nanoparticle-Based Filtering and Sensing Platform for Direct Detection of a Cancer Biomarker in Blood," *Small*, vol. 7, no. 5, pp. 675-682, Mar 7 2011.
- [47] Y. S. Ang and L. Y. L. Yung, "Rapid and Label-Free Single-Nucleotide Discrimination via an Integrative Nanoparticle-Nanopore Approach," *Acs Nano*, vol. 6, no. 10, pp. 8815-8823, Oct 2012.
- [48] C. Escobedo, A. G. Brolo, R. Gordon, and D. Sinton, "Flow-Through vs Flow-Over: Analysis of Transport and Binding in Nanohole Array Plasmonic Biosensors," *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 24, pp. 10015-10020, Dec 15 2010.
- [49] Y. Koh, H. Kang, S. H. Lee, J. K. Yang, J. H. Kim, Y. S. Lee, and Y. K. Kim, "Nanoslit membrane-integrated fluidic chip for protein detection based on size-dependent particle trapping," *Lab on a Chip*, vol. 14, no. 1, pp. 237-243, 2014.
- [50] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2008.
- [51] L. Ceriotti, N. F. de Rooij, and E. Verpoorte, "An integrated fritless column for on-chip capillary electrochromatography with conventional stationary phases," *Analytical Chemistry*, vol. 74, no. 3, pp. 639-647, Feb 1 2002.
- [52] J. A. Molina-Bolivar and F. Galisteo-Gonzalez, "Latex

- immunoagglutination assays," *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews*, vol. C45, no. 1, pp. 59-98, Jan-Mar 2005.
- [53] M. Wiklund, O. Nord, R. Gothall, A. V. Chernyshev, P. A. Nygren, and H. M. Hertz, "Fluorescence-microscopy-based image analysis for analyte-dependent particle doublet detection in a single-step immunoagglutination assay," *Analytical Biochemistry*, vol. 338, no. 1, pp. 90-101, Mar 1 2005.
- [54] S. Vollenhofer-Schrumpf, R. Buresch, and M. Schinkinger, "A simple nucleic acid hybridization/latex agglutination assay for the rapid detection of polymerase chain reaction amplicons," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 68, no. 3, pp. 568-576, Mar 2007.
- [55] J. M. Perez, F. J. Simeone, Y. Saeki, L. Josephson, and R. Weissleder, "Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 34, pp. 10192-10193, Aug 27 2003.
- [56] J. Baudry, C. Rouzeau, C. Goubault, C. Robic, L. Cohen-Tannoudji, A. Koenig, E. Bertrand, and J. Bibette, "Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 44, pp. 16076-16078, Oct 31 2006.
- [57] N. Pamme, R. Koyama, and A. Manz, "Counting and sizing of particles and particle agglomerates in a microfluidic device using laser light scattering: application to a particle-enhanced immunoassay," *Lab on a Chip*, vol. 3, no. 3, pp. 187-192, 2003.
- [58] J. H. Han, K. S. Kim, and J. Y. Yoon, "The enhanced diffusional mixing for latex immunoagglutination assay in a microfluidic device," *Analytica Chimica Acta*, vol. 584, no. 2, pp. 252-259, Feb 19 2007.

- [59] R. Afshar, Y. Moser, T. Lehnert, and M. A. M. Gijs, "Three-Dimensional Magnetic Focusing of Superparamagnetic Beads for On-Chip Agglutination Assays," *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 3, pp. 1022-1029, Feb 1 2011.
- [60] G. Degre, E. Brunet, A. Dodge, and P. Tabeling, "Improving agglutination tests by working in microfluidic channels," *Lab on a Chip*, vol. 5, no. 6, pp. 691-694, 2005.
- [61] S. H. Choi, D. S. Kim, and T. H. Kwon, "Microinjection molded disposable microfluidic lab-on-a-chip for efficient detection of agglutination," *Microsystem Technologies-Micro-and Nanosystems-Information Storage and Processing Systems*, vol. 15, no. 2, pp. 309-316, Feb 2009.
- [62] D. H. Kim, D. S. Shin, and Y. S. Lee, "Spot arrays on modified glass surfaces for efficient SPOT synthesis and on-chip bioassay of peptides," *Journal of Peptide Science*, vol. 13, no. 10, pp. 625-633, Oct 2007.
- [63] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, and R. J. Knapp, "A New Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-Binding Activity," *Nature*, vol. 354, no. 6348, pp. 82-84, Nov 7 1991.

Abstract

Nanoslit membrane integrated microfluidic system for nanoparticle based protein detection

Yul Koh

Electrical Engineering and Computer Science

The Graduate School

Seoul National University

In this paper, a nanofluidic device (Nanoslit-Chip) is proposed to trap nanoparticles for biological assay. The Nanoslit-Chip can be fabricated using standard MEMS fabrication processes such as photolithography, dry etching, and wet etching process. A micro-/nano-particle trapping experiments were performed to evaluate the particle trapping efficiency of the device. And then, the Nanoslit-Chip was used as a detection platform for agglutination assay. Nanoparticle agglomerates that induced by target proteins were successfully trapped and detected in the nanoslit membrane of the Nanoslit-Chip. Finally, the Nanoslit-Chip was connected to a microbead assay chip to enhance the microbead based assay. To evaluate the enhancement of the detection limits, streptavidin-peptide modeling assay were performed. Firstly, in the microbead assay chip, the streptavidin coated nanoparticles are bound to the

microbeads by streptavidin–peptide(LHPQF) affinity interaction. And then, the bound nanoparticles are released from the microbeads and injected to the Nanoslit–Chip. In the Nanoslit–Chip, the nanoparticles are concentrated at a small detection area, which increase the fluorescent signals. As a result, the detection limit of the target nanoparticles is 10^6 /ml, which is 10 times better than the detection limits of the microbead assay chip.

The Nanoslit–Chip consist of a nanoslit patterned membrane, silicon bottom fluid channel, and PDMS top fluid channel. A sample solution is passed through the top fluid channel, the nanoslit membrane, and bottom fluid channel. During the process, nanoparticles are trapped at the nanoslit membrane if the size of nanoparticles larger than the slit width. The Nanoslit–Chip is desirable to have high volume flow rate because it should trap small amount of nanoparticles in very low concentration sample. Therefore, the hydraulic resistance of the Nanoslit–Chip was considered as a main design factor. For this, the relation between the number of nanoslits and the hydraulic resistance of the Nanoslit–Chip had been studied by numerical calculation and finite element method (FEM) simulation.

The fabrication process of the Nanoslit–Chip is as follows. Firstly, a microslit patterned membrane on a silicon substrate was fabricated by using MEMS fabrication process such as photolithography, dry etching, and wet etching. And then, the size of microslit was reduced from 2 μm to 800 nm by silicon oxide (SiO_2) chemical vapor deposition process. Stepper lithography can be used

to make smaller nanoslit patterns (less than 250 nm) instead of the photolithography.

Fluid experiments for a volume flow measurement and a nanoparticle trapping were performed to evaluate the Nanoslit–Chip. The volume flow rate of the Nanoslit–Chip was measured at 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ when we applied 50 kPa at the inlet of PDMS channel. This is enough volume flow rate to transport liquid in a microfluidic system. And next, A 450 nm blue nanoparticles and 1.8 μm red nanoparticles are separated using an 800 nm nanoslit patterned Nanoslit–Chip. The micro–/nano– particles were successfully trapped on the nanoslit membrane depend on the size of the particles when the particle concentrations are less than $10^5/\text{ml}$. Finally, we used the Nanoslit–Chip for agglutination assay. Nanoparticle agglomerates that induced by the target protein (biotinylated bovine serum albumin) were trapped on the nanoslit membrane and detected by fluorescent measurement while the single unbound nanoparticles were passed through the membrane.

Finally, we developed Nanoslit–Chip based detection system. The Nanoslit–Chip based detection system consisted of a microbead assay chip and the Nanoslit–Chip. The microbeads assay chip has a PDMS fluid channel and weir structure to trap 30 μm microbeads. The outlet of the microbead assay chip is connected to the Nanoslit–Chip to trap the nanoparticles that released from the microbeads after assay. After developing the Nanoslit–chip based detection system, peptide – streptavidin modeling assay was performed to study the detection sensitivity of the proposed system.

Peptide sequence LHPQF synthesized 30 μm microbeads and streptavidin coated green fluorescent 450 nm nanoparticles were used for the modeling assay. Firstly, the peptide–streptavidin affinity binding condition and a nanoparticle releasing process was confirmed by optimizing the applied pressure and shaking frequency. And then, we performed the peptide – streptavidin assay in the Nanoslit–chip based detection system and compared the fluorescent signal of the microbead column and the nanoslit membrane area. As a result, the fluorescent signal at the nanoslit membrane is much higher than the microbead column by the nanoparticle concentration and the decrease of background fluorescent signal. As a result, the detection limit of the nanoparticle concentration is $10^6/\text{ml}$, which is 10 times better than the microbeads based detection. As a practical application, we used the Nanoslit–Chip based detection system for peptide – streptavidin affinity test. 3 different peptide sequences LHPQF, FHPQG, IHPQG were used to capture the streptavidin coated nanoparticles using the Nanoslit–Chip based detection system. The detection results showed that LHPQF has the highest affinity and IHPQG has the lowest affinity for streptavidin.

The Nanoslit–Chip is an efficient device to detect small amount of nanoparticles in the sample solution. Specially, the Nanoslit–Chip based detection system can enhance the detection sensitivity of microbead assay by collecting nanoparticles that bound on microbeads by biological interaction. Moreover, the Nanoslit–Chip can be used for various research areas such as peptide library

screening and agglutination assay.

Keywords: Bio-MEMS, Nanofluidic device, Nanoparticle trapping,
Nanochannel, Microbead assay

Student Number : 2010-30207