

루프매개 등온증폭을 위한 칩과 형광 검출 시스템의 제안

김교림, 김종대, 박찬영, 이득주, 김유섭, 황지수*
한림대학교 소프트웨어융합대학

ryfla844264@gmail.com, jdkim@hallym.ac.kr, cypark@hallym.ac.kr,
djlee@hallym.ac.kr, yskim01@hallym.ac.kr, krseattle@hallym.ac.kr

Proposal of chip and fluorescence detection system for loop-mediated isothermal amplification

Gyo-Rim Kim, Jong-Dae Kim, Chan-Young Park,
Deuk-Ju Lee, Yu-Seop Kim, Ji-Soo Hwang*
School of Software, Hallym University

요 약

빠른 진단과 치료를 위한 분자진단 기술은 인류를 치명적인 전염병의 위협에서 보호하는 중요한 요소이다. 더불어 소형의 저렴한 진단 기기 혹은 진단 키트 등의 현장진단 기기에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 논문에서는 단일 온도로 유전자 증폭을 하는 분자 생물학적 기술인 루프 매개 등온 증폭을 위한 바이오 칩과 광 다이오드 기반 저비용 초소형 검출 시스템을 제안한다.

I. 서 론

코로나 19 의 유행으로 인해 빠르고 신뢰성 있는 전염병 진단을 위한 분자생물학적 기술에 많은 관심을 가지고 있다. 열악한 보건 인프라를 가진 개발도상국의 경우 질병의 확산을 빠르게 막기 위해서 현장진단검사 (POCT) 기기나 키트처럼 비용적으로 유리하고 신속한 전염병 검출을 위한 기술의 개발에 많은 관심을 갖고 있으며 많은 연구가 진행되고 있다.

현재 분자 생물학적 진단을 위한 기술 중에 중합효소 연쇄 반응 기법(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 “gold standard” 라 불리며 많이 사용되고 있다. End point 에서만 병원균이나 바이러스의 증폭을 확인하던 conventional PCR 과 정량분석으로 진단을 하는 실시간 PCR(qPCR)이 현재도 많이 사용되고 있다. 그러나, 이 방법은 고가의 장비를 사용하고 숙련된 기술을 요하기 때문에 비용면에서 상당히 불리하다.

또한, 중합효소 연쇄반응은 2 단계 혹은 3 단계의 목표 온도를 사이클링하고 정확한 온도 설정이 결과에 큰 영향을 주기 때문에 정확한 온도 제어가 중요한 요소가 되는데 이를 해결하기 위해서는 까다로운 작업이 필요하다.

그리고, 진단 결과를 얻기 위한 시간도 오래 걸리기 때문에 정확한 치료의 시기를 놓치는 경우도 발생할 수 있다. 따라서, 빠른 시간에 유전자의 증폭 결과를 확인할 수 있는 분자 진단 기술의 개발은 빠른 진단과 치료에 도움을 줄 수 있다.

기존의 중합효소 연쇄반응법의 문제를 극복하기 위해서 정밀한 온도 제어가 필요 없는 등온증폭법에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 그 중에 루프매개 등온 증폭(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

LAMP 는 60~65℃의 일정한 온도의 유지를 통해 증폭이 이루어 지고, 주로 비색 검출을 이용한 방법이 많이 사용되고 있다. 이러한 LAMP 기법은 일반적으로 PCR 기법과 유사한 감도로 1 시간 이내에 완료된다고 알려져 있다.[1] 이러한 장점으로 LAMP 기법은 현장 진단에 상당히 유리하다.

본 논문에서는 LAMP 기술과 광 다이오드 기반 형광 검출시스템을 이용하여 바이오 칩에서의 유전자 증폭과 검출이 가능함을 보인다.

II. 본론

2.1 구동 및 검출 시스템

등온 증폭을 위한 시스템은 바이오 칩 구동시스템과 증폭의 결과를 실시간으로 검출하기 위한 형광 검출 시스템으로 구성되어 있다. 본 논문에서는 칩 구동 시스템은 로컬시스템으로 분류하고 여기에는 마이크로 컨트롤러, 아날로그-디지털 변환기(Analog-to-digital converter, ADC), 펄스-전폭 변조기(pulse-width modulation, PWM)들을 이용하여 온도를 제어하고, USB 인터페이스를 사용하여 호스트 PC 와 로컬시스템을 연결하고 프로토콜 실행들의 기능을 GUI 환경에서 파일 입출력을 통해 처리한다.

여러 목표 온도 제어가 필요한 기존의 PCR 과는 달리 일정한 온도만 유지하면 되므로 검출센서를 사용하여 바이오 칩 구동 시스템은 일정한 온도를 유지할 수 있도록 제어했다. 따라서, 열을 식히기 위한 냉각 장치는 사용하지 않았다.

증폭 결과를 실시간으로 확인 및 분석을 하기 위해 암실 환경에서 작은 렌즈들과 광 다이오드 (Photodiode)를 이용하여 제작한 형광 검출 시스템을 이용하여 등온 증폭 과정에서의 형광 밝기 변화를 측정하여 비교했다. 광원은 청색 LED 를 사용하고, 광원과 검출 센서 앞에는 특정 형광 파장의 검출을

위해서 여기 필터(excitation filter)와 방출 필터(emission filter)를 배치했다. [2]

위에서 언급한 바와 같이 본 논문에서 제안하는 형광 검출시스템은 작은 크기의 광 다이오드와 렌즈들을 이용하여 광학부를 구성했기 때문에, 공간적으로 유리한 시스템을 제작할 수 있다.

2.2 Biochip

연구에 사용된 바이오 칩은 무광 검정색 인쇄회로 기판(Printed Circuit Board; PCB)과 양면테이프, 플라스틱 커버를 사용해 챔버를 구성했다. PCB 는 검은색 무광 기판을 사용하여 검출 영역 외의 빛의 반사를 막았고, 온도 제어를 위한 히터 및 측정을 위한 온도 센서 (NTC thermistor)가 포함되어 있다. 가열을 위한 히터패턴은 구리로 제작하고 열 분포를 고르게 하기 위해서 thermal spread 를 포함하고 있다. 또한, 히터 부분은 형광의 측정을 위해서 주석으로 코팅하여 형광 밝기를 측정했다.[3]

시약이 담기는 챔버 부분은 투명한 폴리카보네이트로 미세 유체 채널을 제작하고, 양면테이프로 반응 챔버를 밀봉하고, 외곽부분은 플라스틱 하우징을 제작하여 칩 커넥터에서 고정이가 잘 되도록 했다.

2.3 실험 재료 및 방법

증폭 실험에 사용된 샘플로는 10^5 copy/ μ L 농도의 Lambda phage DNA 를 사용하고, cellsafe 사의 등온 증폭 키트인 LAMplex COVID-19 RT-qLAMP Detection Assay)를 사용했다. 실험에 사용된 시약의 조성은 표 1 과 같이 구성했고, 총 50 μ L 로 제조한 후, 35 μ L만 칩에 주입하여 증폭실험을 진행했다.

표 1. 증폭 실험을 위한 시약의 조성

시약명	용량
2X RT-LAMP Master Mix	25 μ L
RT-LAMP Enzyme Mix	2 μ L
Primer mix	4 μ L
Nuclease free water	9 μ L
Sample (Positive control /Negative control)	10 μ L
합계	50 μ L

실험은 프로토콜에 따라 2 단계로 증폭실험을 진행했다.

먼저 50℃에서 10 분간 pre-heating 을 진행한 후 68℃에서 30 초를 1 사이클로 설정 후 30 사이클 (총 15 분) 수행후의 형광 밝기를 측정했다. 샘플의 종류에 따라서 positive control 로 3 회, negative control 로 2 회 수행한 후 밝기를 비교했다.

III. 결과

실험에 사용된 형광 염료는 기존에 연구팀에서 사용하던 FAM (6-carboxyfluorescein) 형광과 같은 파장대인 SYBR Green 1 (SG)을 사용했다. 실험결과 그림 1 에서와 같이 Negative control 에서는 밝기의 변화가 거의 없는 것으로 보여 진다. 반면, positive control 에서는 밝기의 차이가 크지는 않으나 14 사이클부터 지수적 증가를 보이며 밝기가 증가하는 것을 볼 수 있다.

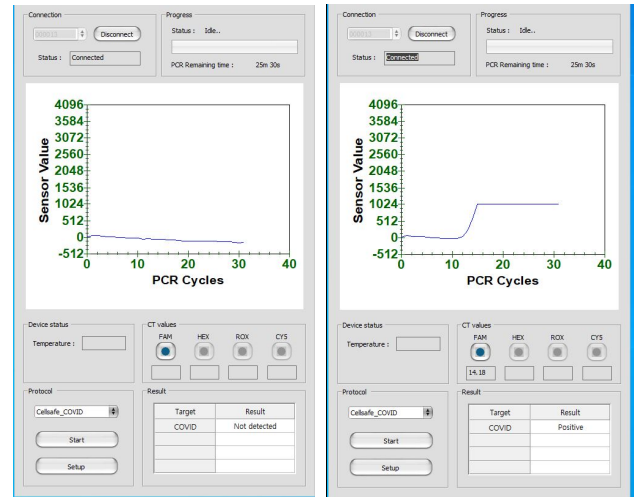


그림 1. 등온 증폭 결과 (a) Negative control (b) positive control

현재 칩을 수직으로 커넥터에 꽂아 증폭실험을 진행하므로, 반응 챔버 안의 시약이 균일하지 않아서 밝기의 차이가 작을 수 있다. 추후의 실험에서는 칩을 수평으로 눕혀서 증폭 실험을 진행한 결과와의 비교 분석이 필요해 보인다.

IV. 결론

본 논문에서는 인쇄회로 기판, 테이프, 플라스틱으로 제작한 바이오 칩과 크기가 작은 광 다이오드를 사용한 형광 검출 시스템을 이용하여 등온 증폭 실험의 결과를 보였다. 규모가 작은 광학부품을 사용하기 때문에 전체 시스템을 작게 제작할 수 있었다.

실험 결과에서 형광 밝기의 차이가 크지 않지만 검출이 가능함을 보여준다. 이러한 문제를 보완하기 위하여 다양한 소재를 사용하여 제작한 칩을 이용한 증폭 실험의 결과 분석이 필요해 보인다. 또한, 현재 수직으로 칩을 세워서 증폭을 진행하는 방식을 수평으로 눕히는 방식으로 변경 후 실험하여 성능의 향상을 고려할 필요가 있다고 본다.

ACKNOWLEDGMENT

이 연구는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2021R1A2C10113 05)

참 고 문 헌

- [1] T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita, and H. Kanda, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects," *Journal of microbiology*, vol. 53, no. 1, pp. 1-5, 2015.
- [2] D.-J. Lee, J.-D. Kim, Y.-S. Kim, H.-J. Song, and C.-Y. Park, "Evaluation-independent system for DNA section amplification," *Biomedical engineering online*, vol. 17, no. 2, pp. 1-12, 2018.
- [3] J. S. Hwang, Y. S. Kim, H. J. Song, J. D. Kim, and C. Y. Park, "Fluorescence detection test by black printed circuit board based microfluidic channel for polymerase chain reaction," *Technology and Health Care*, vol. 24, no. s1, pp. S139-S146, 2016.