

미세 유체 분배 기법을 이용한 혈액형 검사 키트의 개발

¹강원대학교 의과대학 진단검사의학교실, ²(주) 디지털바이오테크놀로지,
³서울대학교 공과대학 기계항공공학부, ⁴전기컴퓨터공학부, ⁵고려대학교 의과대학 진단검사의학교실

서인범¹ · 유숙원¹ · 이용구^{2,3} · 허대성² · 정찬일² · 장준근^{2,4} · 임채승⁵

Development of a New Blood Typing Kit Using the Microfluidics Separation Technique

In Bum Suh, M.D.¹, Sook Won Ryu, M.D.¹, Yongku Lee^{2,3}, Dae Sung Hur²,
Chanil Chung, Ph.D.², Jun Keun Chang, Ph.D.^{2,4} and Chae Seung Lim, M.D.⁵

¹Department of Laboratory Medicine, Kangwon National University College of Medicine, Chuncheon, ²Digital Bio Technology Co,
³Seoul National University School of Mechanical and Aerospace Engineering, ⁴Seoul National University School of Electrical Engineering
and Computer Science, ⁵Department of Laboratory Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Blood typing is an essential test for transfusion. Generally, blood typing is performed using a slide test, tube test or microcolumn agglutination test. The aims of this study were to develop a new blood typing kit using micromachining, microfluidics and microseparation methods, and to evaluate the clinical usefulness of the new blood typing kit.

Methods: We designed and manufactured a blood typing microchip using polydimethylsiloxane (PDMS), which contained a microchannel (25 ~ 200 μm). The blood sample and antisera to be tested were dropped on the microwell for movement and mixing by capillary action. Once agglutination occurred, the microchannel acts as a filter and the blood type was determined by observation by the naked eye. To evaluate the new typing kit, we tested sensitivity using artificially diluted blood and compared the results of the new typing method with the slide and tube methods using 70 samples.

Results: The new blood typing kit could differentiate a +4 ~ +2 agglutination reaction, but could not detect a +1 agglutination reaction as observed by the naked eye. Among 70 samples, the results of ABO and Rh typing by the new typing method (n=66, ≥ +2 agglutination reaction by the column agglutination method) were in accord with the results of the tube and slide methods, but could not detect agglutination in all 4 clinical samples, below a +1 agglutination reaction.

Conclusion: The new blood typing kit is inadequate for routine use in the clinical laboratory due to low sensitivity, but with further improvement, it can be used economically, conveniently and objectively for blood typing without any special equipment. Moreover, the microfluidics and separation method may be broadly applicable in other tests using the hemagglutination method. (*Korean J Hematol* 2007;42: 392-396.)

Key Words: ABO, Rh, Blood typing, Microfluidics, Microseparation

접수 : 2007년 10월 15일, 수정 : 2007년 12월 13일
승인 : 2007년 12월 17일
교신저자 : 임채승, 경기도 안산시 단원구 고잔동 516
☎ 452-020, 고려대학교 의과대학 부속 안산병원
진단검사의학과
Tel: 031-412-5300, Fax: 031-412-5314
E-mail: malarim@korea.ac.kr

본 논문은 2002년도 중소기업청 중소기업기술혁신개발사업
의 지원으로 수행된 연구임.

Correspondence to : Chae Seung Lim, M.D.
Department of Laboratory Medicine, Korea University College
of Medicine
516, Gojan-dong, Danwon-gu, Ansan 452-020, Korea
Tel: +82-31-412-5300, Fax: +82-31-412-5314
E-mail: malarim@korea.ac.kr

서론

Karl Landsteiner와 Wiener에 의해 ABO 및 Rh 혈액형이 발견된 후, ABO 및 Rh 혈액형 검사는 수혈에 있어서 가장 중요한 검사가 되었으며, 대부분 슬라이드나 시험관을 이용하여 응집을 관찰하는 방법을 사용하고 있다. 이러한 검사 방법은 ABO 불일치 등 여러 원인에 의해 항원이 약화된 경우, 객관적으로 비교할 수 없어 결과 판정은 검사자에 따라 달라질 수 있다.¹⁾

최근 도입되고 있는 microcolumn 응집법을 이용한 검사법은 객관적인 결과 판독, 민감도, 특이도 및 효율성을 높이고 정도관리가 용이하나 혈액형 검사전용 원심분리기와 배양기가 필요하고 검사 시간이 소요되며, 상대적으로 비싼 sephadex G100 gel 또는 glass bead가 포함되어 있는 microcolumn을 필요로 하며 그 유효기간도 1년 이내이다.^{2,3)}

본 연구에서는 최근 소개되고 있는 미세유체제어(microfluidics) 및 미세분배기술(microseparation)을 적용하여⁴⁻⁶⁾ 객관적인 결과 판독이 가능하고 저가이며, 응급 인력이나 개인이 간편하고 쉽고 정확하고 빠르게 추가 장비 없이 검사할 수 있는 혈액형 검사를 개발하고, 이의 임상적 유용성을 평가해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 미세 유체 분배를 이용한 혈액형 검사 키트의 고안

최근 도입되고 있는 microcolumn을 이용한 혈액형 검사법은 sephadex G100 gel 또는 glass bead를 microcolumn 내에 넣어 응집반응으로 인한 크기의 변화와 molecular sieving effect 원리에 따라 필터링됨으로써 결과를 판독할 수 있다. 이러한 필터링 원리를 미세 유체 분배 기술을 이용한 마이크로칩에 적용하여 혈액형 검사 키트를 제작하고자 하였다.

2. 미세 유체 분배를 이용한 마이크로 칩의 기술 개발

미세 유체 분배를 이용한 혈액형 검사용 마이크로 칩을 제작하기 위해 마이크로 전자 기계 시스템(micro eletro mechanical system, MEMS) 공정 기술을 이용하고, 무동력 구동 시스템의 최적화를 위해 플라스틱칩에 대해 표면 재질을 분석하고 개발하였으며, 혈구 응집 반응을 검출하기 위해 미세 필터를 설계, 제작하였다.

3. 혈액형 검사용 마이크로 칩의 구조

플라스틱 마이크로 칩의 기본 구조는 샘플 주입구(Sample inlet), 시약 주입구(Reagent inlet), 필터부(Filter part), 판독창(Reading part) 및 마이크로 채널로 이루어지도록 하여 검사하고자 하는 환자의 전혈을 샘플 주입구에 떨어뜨리면 모세관 현상에 의해 주입된 시약(항체)과 반응부에서 반응이 일어나고, 필터부에서 응집반응에 의한 크기 차이에 의해서 필터링이 일어나게 되고 이를 판독창에서 사용자가 판독하도록 설계하였다(Fig. 1). 필터부는 필터의 간격을 200 μm, 70 μm 및 25 μm로 설계하여 응집이 일어난 입자를 반응 강도에 따라 구분할 수 있도록 설계하였다. ABO 및 Rh 혈액형을 동시에 검사할 수 있도록 하기 위하여 하나의 샘플

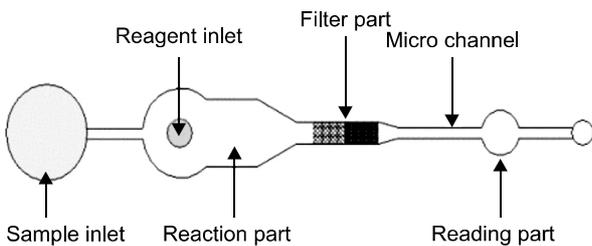


Fig. 1. The basic parts of blood typing microchip.

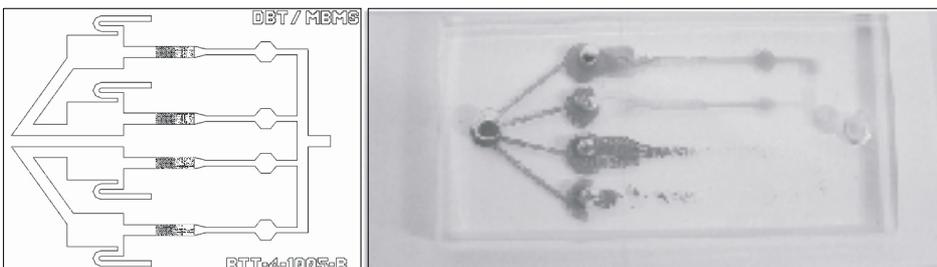


Fig. 2. The schematic diagram and photograph of blood typing microchip.

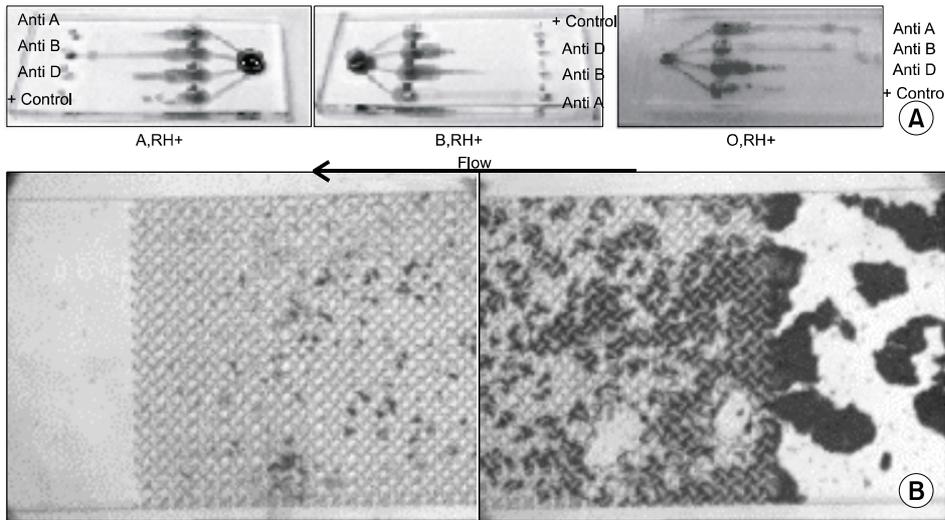


Fig. 3. The blood typing results using Microfluidics-Techniques (A) and the filtering effect of blood typing microchip in +2 agglutination reaction (B).

주입구에서 네 개의 시약 주입구가 포함된 반응부로 샘플이 나뉘어지도록 마이크로칩을 제작하였다(Fig. 2).

4. 미세 유체 분배를 이용한 혈액형 검사

플라스틱 마이크로 칩과 항-A, 항-B 및 항-D 항체 (Biscot, Serologicals Ltd, Livingston, UK)를 준비하고 시약 주입구, 환기부를 테이프를 막은 후, 환자의 전혈을 샘플 주입구에 떨어뜨렸다. 시약주입구 부위의 테이프를 열고 각각의 시약을 5 μ L씩 떨어뜨린 다음 환기부의 테이프를 열어 놓으면 모세관 현상에 의해 즉시 필터부와 판독창으로 혈액이 이동하게 되므로 판독창 및 필터부에서 응집을 판독하여 환자의 혈액형 및 반응 강도를 결정한다(Fig. 3).

5. 혈액형 검사 키트의 평가

1) 대상

혈액형 검사 키트의 민감도를 보기 위하여 각 혈액형(A, B, AB, O, Rh 양성 및 음성)별로 2개씩의 일반 환자의 전혈과 생리 식염수로 배수 희석한 항혈청을 microcolumn 응집법으로 검사하여, 인위적으로 혈액은 행 기준에 따라 반응 강도를 +4에서 -까지 6단계로 만든 후 검사하였다. 일반 환자를 대상으로 microcolumn 응집법에서 검사상 \pm , +1, +2 등의 반응 강도를 보이는 8명을 포함한 70명의 검체를 대상으로 하였다.

2) 방법

각 대상 검체를 microcolumn 응집법, 슬라이드법, 튜브법 및 미세 유체 분배를 이용한 방법으로 검사하여 비교 분석하였다. 슬라이드와 튜브법을 이용한 혈액형 검사(혈구형 검사)는 통상적인 방법으로 세 명의 검사

자에 의해 판독하였으며, microcolumn 응집법은 Dia-Med사(Morat, Switzerland)의 ID Micro Typing System을 이용하여 검사하였다.

결 과

1. 혈액형 검사법의 민감도 비교

Microcolumn 응집법을 기준으로 ABO 혈액형별로 +4에서 -까지의 응집 강도를 보이는 각각 2개씩의 검체에 대하여, 슬라이드법, 튜브법 및 미세 유체 분배를 이용한 방법으로 검사한 결과, +4에서 +2 응집 강도를 보이는 검체에서는 검사 결과가 완전히 일치하였다. 그러나 미세 유체 분배를 이용한 검사에서는 +1과 \pm 응집 강도를 보이는 검체(n=16) 중 3예에서만 응집이 관찰되었고, 슬라이드법 및 튜브법에서는 +1 응집 강도까지는 결과가 일치하였으나, \pm 응집 강도를 보이는 검체 중, 슬라이드법에서 5예는 음성으로 판정되었고, 튜브법에서는 1예가 음성으로 판정되었으며, 2예는 3명의 검사자 간에 판독 결과가 불일치하였다.

2. 임상 검체에서 혈액형 검사법의 비교

70명의 환자 검체를 대상으로 ABO 및 Rh 혈액형 검사를 시행한 결과, microcolumn 응집법을 기준으로 +2 이상의 응집 강도를 보이는 66명에서는 슬라이드법, 시험관법 및 미세 유체 분배를 이용한 방법 모두에서 일치하였으나, 미세 유체 분배를 이용한 방법에서 +1 이하 4예 모두에서 응집을 보이지 않았고, 슬라이드법 및 시험관법에서는 \pm 응집 강도를 보이는 1예를 음성으로 판정하였다. 추가로 미세 유체 분배를 이용한 방

법의 검사 소요 시간은 피펫의 숙련도에 따라 40초에서 2분(평균 1분 28초)이 소요되어 슬라이드법과는 큰 차이가 없으나 시험관법 및 microcolumn 응집법에 비해서는 단축되었다.

고 찰

ABO 및 Rh 혈액형 검사는 슬라이드나 시험관을 이용하여 응집을 관찰하는 방법이 보편화되어 있다. 그러나 이러한 검사 방법은 ABO 변이형, 여러 원인에 의한 항원성의 변화, 획득 B형 등과 같은 ABO 불일치 항원이 악화될 경우, 응집 여부를 객관적으로 판독할 수 없어 결과 판정은 검사자에 의존해야 하며, 검사자의 경험과 숙련도에 따라 달라질 수 있어 실제 수혈 시 문제가 될 수 있다.¹⁾ 이러한 단점을 보완하고 검사의 자동화를 위해 최근에는 microcolumn 내부에 gel 또는 glass bead를 넣어 크기에 따른 필터링 효과를 이용하여 검사하는 microcolumn 응집법이 개발되었다.²⁾ 이 방법은 객관적인 결과 판독이 가능하고, 특이도와 효율성이 높으며 정도관리가 용이하고 자동화가 가능하다. 그러나 microcolumn 응집법을 이용한 검사는 상대적으로 고가인 sephadex G100 gel 또는 glass bead가 포함되어 있는 키트를 필요로 하며 그 유효기간도 1년 이내이다. 특히 검사 시 원심 분리 및 항온을 위한 시간이 소요되며, 전용 원심분리기 및 배양기가 필요해서 응급 시에 즉시 현장에서 검사하기 어려운 단점이 있다.^{2,3)}

최근 MEMS 공정 기술, 미세유체역학 기술을 포함한 마이크로칩 제조 기술의 발달로 이를 이용한 진단용 검사키트의 개발이 시도되고 있다.^{7,8)} 이 연구에서는 이러한 미세 유체 분배 기술을 이용하여 응급 현장에서 즉시 검사가 가능한 혈액형 검사 키트를 개발하고자 하였다. 미세 유체 분배 기술을 이용한 혈액형 검사 키트를 개발하기 위해 비교적 저가이며 대량 생산이 가능하며, 혈액의 이동이 잘 되도록 친수성(hydrophilic)으로 표면처리가 용이한 PDMS (polydimethyl siloxane)를 재료로 선택하였고⁹⁾ 모세관 내의 유동 특성을 분석하여 플라스틱 칩의 표면 재질을 분석하고 필터링에 대한 설계를 하여 플라스틱 MEMS 공정 기술로 혈액형 검사 키트를 제작하였다.

응집반응으로 인한 크기의 변화에 따라 필터링되어 결과를 판독하기 위해 필터의 간격을 200 μm , 70 μm , 25 μm 로 제작하였고 필터의 모양을 변화시키면서 최적의 조건으로 혈액형 검사 키트를 제작하였다. 혈액

형 검사 키트의 평가 결과, 필터의 간격이 200 μm 에서는 +4, 70 μm 에서는 +3, 25 μm 에서는 +2의 응집강도를 객관적으로 검출할 수 있었으나 +1 이하의 응집강도는 검출하지 못했다. 본 연구에서는 모세관현상에 의한 유체의 최적 속도와 이에 대한 마이크로 채널의 최적 폭을 실험적으로 구하여 전체 시스템의 무동력 미세 유체 제어를 실현하였다. 그러나 기존의 microcolumn 응집법을 이용한 검사법의 gel 또는 glass bead 사이의 간격이 40 μm 로 알려져 있는데 본 혈액형 검사 키트의 필터 간격보다 더 넓은에도 불구하고 민감도가 높게 나타났다. 이는 gel 또는 glass bead를 이루고 있는 입자의 표면 및 microcolumn에 포함되어 있는 용액에 의한 작용에 의한 것으로 생각한다. 본 혈액형 검사 키트에서 +1 이하의 응집 강도를 검출하기 위해서는 필터의 간격이 더 조밀하고 원활한 혈액의 이동을 위한 추가적인 표면 처리 및 필터 모양의 개선이 필요하다.

재료로 이용한 PDMS는 다른 중합체를 molding할 때, 접착이 잘 일어나지 않으며, 매우 내구성이 강하여 여러 번 사용해도 변성이 일어나지 않는 장점이 있어 선정하였다.⁹⁾ 그러나 본 연구에서 PDMS는 표면처리 후, 시간이 지남에 따라 표면의 변화가 급속히 일어나서 친수성의 표면이 쉽게 소수성의 표면으로 변하여 무동력으로 샘플을 구동하는 데 어려움이 있었다. 추후 이를 개선하기 위해서 고분자 자체의 유동성이 작고 표면개질 후, 변화가 크게 일어나지 않는 플라스틱 재질인 polymethyl methacrylate¹⁰⁾, polycarbonate 및 polystyrene 등¹¹⁾의 물질 특성을 조사하여 본 연구에서 개발한 플라스틱 마이크로 칩에 적용하는 연구가 필요하다고 생각한다. 본 연구에서는 혈구형 검사에 국한하여 연구를 하였는데 혈액형은 혈청형 검사도 동시에 검사하여 결정하므로 추후 이에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서 개발된 혈액형 검사 키트는 민감도가 낮아 혈액은행에서 이용하기는 어렵지만 추후 이를 보완한다면 위급한 상황에서 수혈을 받아야 하는 환자들에 대한 현장에서의 빠른 혈액검사 판독이 가능해질 것이다. 또한 채혈이 어려운 소아, 신생아 등의 경우, 소량의 샘플로 검사가 가능하며, 부가장치가 필요 없이 반정량 검사가 가능하고 간단하고 편리하게 사용할 수 있을 것으로 생각한다. 플라스틱 마이크로 칩은 본 연구에서 제작된 주형(frame)을 이용하여 저가의 실리콘으로 대량생산이 가능하며, 기존 검사법인 슬라이드 및 시험관법에 비해 소량의 항혈청으로 검사할 수 있

어 매우 경제적이다. 추가로 플라스틱 마이크로 칩의 혈액 주입구에 채혈침 등을 부착하면 사용자가 플라스틱 마이크로 칩을 보다 편리하게 사용할 수 있을 것이다. 본 연구에서 개발된 필터링 기법의 민감도를 개선한다면 혈액형 검사뿐만 아니라 불규칙항체 선별검사 등 혈구응집법을 이용하는 다른 여러 검사에 적용하여 여러 종류의 현장진단용 마이크로칩을 개발할 수 있리라 기대된다.

요 약

배경: 혈액은행의 필수검사 항목인 혈액형 검사는 일반적으로 슬라이드법 또는 튜브법을 사용하거나 gel card를 이용한 microcolumn 응집법을 사용하고 있다. 본 저자들은 플라스틱 마이크로 머시닝 기술과 미세유체 제어 및 분배기술을 이용한 혈액형 검사 키트를 개발하여 혈액형 검사에서 임상적 유용성을 알아보고자 하였다.

방법: 마이크로칩에 이용되는 PDMS를 이용하여 혈액의 응집 여부를 검출할 수 있도록 25~200 μm 의 플라스틱 미세 채널 및 모세관 현상을 이용하여 마이크로칩을 설계, 제작하여 혈액과 항혈청을 섞어 모세관 현상에 의해서 이동하도록 한 뒤 응집 여부를 육안으로 판정하였다. 적혈구 응집강도를 혈액은행 기준에 따라 6단계로 인위적으로 만들어 본 혈액형 검사 키트에서 검사하여 검출 민감도를 확인하였고 환자 검체(70명)에서 ABO 및 Rh혈액형 검사를 실시하여 슬라이드법 및 튜브법과 비교하였다.

결과: 새 혈액형 검사 키트의 민감도는 +4에서 +2까지 구분이 가능하였고 +1 이하에서의 구분은 육안적으로 불가능하였다. 70명의 검체를 대상으로 혈액형 검사를 시행한 결과, +2 이상의 응집 강도를 보이는 66명에서는 슬라이드법, 시험관법 및 미세 유체 분배를 이용한 방법 모두에서 일치하였으나, 미세 유체 분배를 이용한 방법에서 +1 이하 4예 모두에서 응집을 보이지 않았다.

결론: 본 연구에서 개발한 나노 유체 분배를 이용한 혈액형 검사키트는 응급검사로 특별한 장비가 필요 없으며, 사용하기 편리하고 반정량이 가능하다. 예민도가 부족하여 즉시 혈액은행 검사용으로 상용하기에는 어렵겠지만 추후 이를 보완한다면 객관적인 혈액형 검

사에 이용이 가능할 것으로 생각하며, 혈구응집반응을 이용한 다른 검사에도 다양하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) Landsteiner K. Agglutination phenomena of normal human blood. *Wien Klin Wochenschr* 2001;113:768-9.
- 2) Shin JW, Jeong SH, Nahm CH, Kim HY, Kwon OH. The direct antiglobulin test and antibody screening test based on the antiglobulin gel technique. *Korean J Clin Pathol* 1996;16:411-8.
- 3) Chang SH, Lee NY, Choi YC, Yoo BJ, Suh JS. Irregular antibody screening in cord blood by column agglutination test. *Korean J Blood Transfus* 1997;8:65-72.
- 4) Nilsson A, Petersson F, Jonsson H, Laurell T. Acoustic control of suspended particles in microfluidic chips. *Lab Chip* 2004;4:131-5.
- 5) Petersson F, Nilsson A, Holm C, Jonsson H, Laurell T. Separation of lipids from blood utilizing ultrasonic standing waves in microfluidic channels. *Analyst* 2004;129:938-43.
- 6) Whitworth G, Grundy MA, Coakley WT. Transport and harvesting of suspended particles using modulated ultrasound. *Ultrasonics* 1991;29:439-44.
- 7) Ziaie B, Baldi A, Lei M, Gu Y, Siegel RA. Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:145-72.
- 8) Deisingh AK. MEMS technology in analytical chemistry. *Analyst* 2003;128:9-11.
- 9) Kim YD, Park CB, Clark DS. Stable sol-gel microstructured and microfluidic networks for protein patterning. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:331-7.
- 10) Fiorini GS, Jeffries GD, Lim DS, Kuyper CL, Chiu DT. Fabrication of thermoset polyester microfluidic devices and embossing masters using rapid prototyped polydimethylsiloxane molds. *Lab Chip* 2003;3:158-63.
- 11) Chabinc ML, Chiu DT, McDonald JC, et al. An integrated fluorescence detection system in poly(dimethylsiloxane) for microfluidic applications. *Anal Chem* 2001;73:4491-8.