

고효율 바이오펜질 분리 및 농축을 위한 나노필터소자제작

허윤석* · 최봉길 · 홍원희†

한국과학기술원 생명화학공학과
305-701 대전광역시 유성구 과학로 335
*한국기초과학지원연구원 물성과학연구부
305-333 대전광역시 유성구 과학로 113
(2012년 2월 9일 접수, 2012년 3월 28일 채택)

Fabrication of Nano-filter Device for High Efficient Separation and Concentration of Biomolecules

Yun Suk Huh*, Bong Gill Choi and Won Hi Hong†

Department of Chemical & Biomolecular Engineering (BK21 program), KAIST, 335 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

*Division of Material Science, Korea Basic Science Institute, 113 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea

(Received 9 February 2012; accepted 28 March 2012)

요 약

본 연구에서는 알루미늄 나노 템플레이트(anodic alumina oxide; AAO)를 이용하여 신속하면서도 효과적으로 나노 입자 및 바이오펜질을 분리, 농축할 수 있는 나노필터 소자를 개발하였다. 본 연구에서 사용한 나노필터 소자는 유체의 주입 및 흐름이 가능한 미세유체채널(microfluidic channel)을 PDMS에 패터닝하였다. 위아래로 형성된 PDMS 미세유체채널 사이로, 다양한 크기의 나노 다공을 형성하고 있는 AAO 막을 삽입하여 크기에 따른 나노입자 및 바이오펜질을 분리할 수 있었다. 위아래로 PDMS 유체채널과 AAO 분리막을 집적하고, 최종적으로 아크릴레이트 플라스틱(acrylic plastic)으로 전체 소자를 고정하여 나노필터유체소자를 제작하였다. 완성된 나노필터소자를 이용하여 나노입자의 농축효율 및 은나노입자가 묻쳐져있는 필터존(filtration zone)으로부터 뎅기 바이러스(dengue virus)를 표면증강라만(surface enhanced Raman scattering)분석법에 의해 검출할 수 있었다.

Abstract – Here, we develop a new nanofilter device for the rapid and efficient separation of nanoparticles and biomolecules, exploiting the use of AAO membrane with ordered nanopores in the range from 20 nm to 200 nm. Briefly, the chip comprises of a series of the upper and lower PDMS channels containing embedded inlet and outlet ports, and 50 μm width microfluidic channel, and AAO membrane to be made the filtering zone. After assembling these components, the acrylate plastic plates were used to fix the device on the top and bottom side. When introducing the samples into the inlet ports of the upper PDMS channel, we were able to separate and concentrate the nanoparticles and target molecules at the filtering zone, and to elute the solutions containing the unwanted materials toward the lower PDMS channels normal to the direction of AAO membrane. To demonstrate the usefulness of the device we apply it to the SERS detection of nucleic acid sequences associated with Dengue virus serotype 2. We report a limit of detection for Dengue sequences of 300 nM and show excellent enhancement of Raman signals from the filter zone of the nanofilter device.

Key words: Nanofilter Device, AAO, Concentration, SERS, Dengue Virus

1. 서 론

물질을 크기에 따라 분리 및 농축하는 공정은 오랜 역사를 통해 발전되어 왔으며, 현재까지도 이러한 기술은 화학적 공정에서부터 생체물질에 이르기까지 다양하게 응용 개발되어 연구되어지고 있다. 보편적으로 알려져 있는 물리적 필터링 방법은 1900년대 초반부터

화학공학자들에 의해 활발히 연구되기 시작하여 1970년대에 들어 이론적체계가 준비되기 시작했다[1]. 이러한 필터링 방법은 필터의 크기가 입자보다 크면 입자는 머무름 없이 필터를 빠져나가게 되고, 필터의 크기가 작으면 입자는 모두 걸러지게 되는 원리를 이용하는 것이다. 1990년대 들어서 나노기술의 발전과 더불어 나노수준의 기공을 갖는 고분자 젤이나 track etch 법으로 제작된 막(membrane)이 개발되었고, 이를 상용화하면서 바이오펜질 및 화학물질들을 분리, 정제하는 과정에 널리 사용되기 시작했다[1-5].

최근에는 나노기술과 MEMS 기술의 발전으로 이를 단일의 유체

† To whom correspondence should be addressed.
E-mail: whhong@kaist.ac.kr

*이 논문은 KAIST 홍원희 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

소자 내에 나노 구조물로 패터닝하여 적은 양의 시료만으로도 필요로 하는 물질을 신속히 분리 및 정제할 수 있게 되었으며, 이러한 기술들을 생명공학 및 의료공학 분야에 적용하고자 하는 노력들이 활발히 이루어지고 있다. 또한, 발전된 MEMS/NEMS 기술은 보다 정밀하게 나노구조물을 원하는 위치에 수 나노의 오차한계로 패터닝할 수 있게 되었으며, 이러한 기술은 미세유체채널과 결합되어 미세종합분석시스템(micro total analysis system; μ -TAS) 또는 랩온어칩(Lab-on-a-chip)으로 활발히 연구되어지고 있다[6,7]. μ -TAS는 시료 채취 영역, 미세유체회로, 검출기 및 이들을 제어할 수 있는 제어부(controller)로 구성된다. 따라서 μ -TAS를 구현하기 위해서는 플라스틱이나 유리, 실리콘 등의 표면에 용액이 흐를 수 있는 미세채널로 회로를 만들어 시료의 전처리, 분리, 혼합, 생화학반응, 검출 등을 하나의 칩에 소형화, 집적화시킬 수 있어야 한다. 현재까지 이러한 모든 기능이 통합된 μ -TAS 개발 보다는 몇 가지 기능을 수행할 수 있는 랩온어칩, 정확한 의미로는 특정기능을 수행하는 바이오유체소자(bio-fluidic device) 분야의 개발이 활발한 실정이다. 특히, 많은 연구가 특정 질병의 DNA 또는 단백질 표지물질을 전기화학, 분광학적인 방법들을 적용하여 검출하는 연구에 집중되어 수행되어졌다. 그러나, 궁극적인 μ -TAS 또는 랩온어칩의 구현을 위해서는 미세소자 내에서 시료의 전처리단계를 신속하면서도 효율적으로 수행할 수 있는 방법이 개발되어야한다[8-10].

본 연구에서는 시료 전처리의 중요성이 더해지는 바이오센서, 바이오칩분야에 널리 적용될 수 있는 나노필터시스템을 개발하는 연구를 수행하였다. 시료의 전처리 단계로 개발되었던 기존의 전기영동(electrophoresis), 유전영동(dielectrophoresis), 나노구조물을 활용한 나노필터방법들은 미세소자로의 구현에 있어 복잡한 공정과 고가의 공정비용을 요구한다. 따라서, 본 연구에서는 나노수준의 다공이 형성된 상용 AAO 막과 미세패턴이 형성된 PDMS 유체채널을 결합하여 나노필터시스템을 손쉽게 구현할 수 있었다. 또한, 본 연구에서 구현된 소자를 활용하여 나노입자의 농축 및 표면증강라만(surface enhanced Raman scattering; SERS)분석법을 적용하여 뎅게열 바이러스를 검출할 수 있었다.

2. 실험 재료와 방법

2-1. 나노필터소자 제작

나노필터소자는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 아크릴레이트 기관 Poly(methyl methacrylate; PMMA), PDMS (polydimethylsiloxane) 유체 채널, 나노크기의 기공(20, 100, 200 nm)을 갖는 AAO 막으로 구성되어 있다. PDMS 미세유체채널의 제작을 위하여 일반적으로 미세패턴을 위한 소프트리소그라피(soft-lithography)공정을 적용하였다. 구체적으로, SU-8 감광성 고분자를 이용하여 채널의 높이를 50 μ m로 실리콘웨이퍼 위에 제작 후, PDMS로 유체채널을 전사하였다. 위아래로 유체채널이 패터닝 되어있는 PDMS를 사이에 두고, 20 nm 크기의 기공을 갖고 있는 AAO 막을 삽입하였다. 최종적으로, 안정적인 유체의 흐름조절 및 소자의 구동을 위하여 아크릴레이트 기관을 이용하여 전체 소자 시스템을 고정하였다.

2-2. 나노입자 농축실험

제작된 나노필터소자의 농축특성을 분석하기 위하여, 44 nm 크기의 FITC 형광물질이 코팅되어 있는 polystyrene beads를 이용하였다. 위

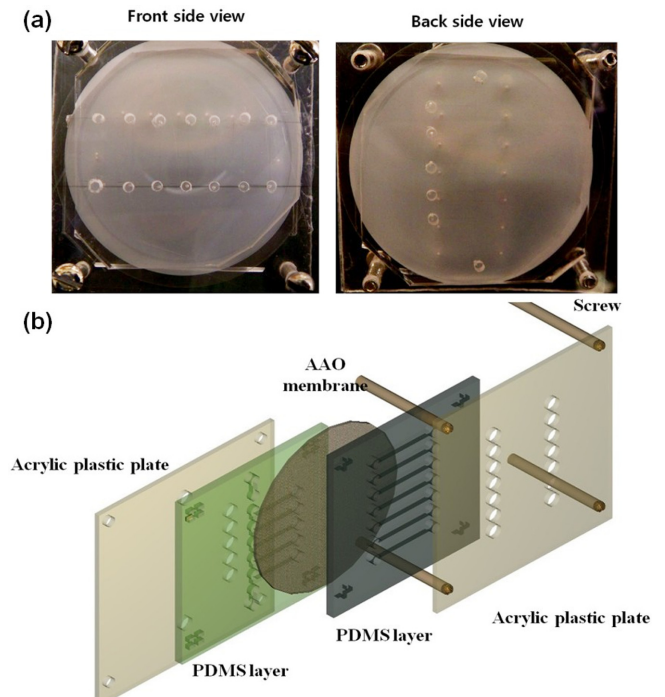


Fig. 1. (a) Photo images of nanofilter device by assembling between PDMS fluidic channels and AAO membrane with 20 nm pore size. (Left image: front side view, right image: back side view), (b) Overview of chip fabrication process.

쪽의 PDMS 유체채널 주입구를 통하여 5 μ L/s 유속으로 주입하였고, 아래의 PDMS 유체채널 출구를 통해서 10 μ L/s의 유속으로 실린지 펌프(syringe pump)를 이용하여 용출하였다. AAO 막의 기공크기는 20, 100, 200 nm로 선정하여 농축 및 분리효율을 분석하였다. PS beads의 농축 및 분리효율은 시간변화에 따라 형광이 변화되는 정도를 분석하였다.

2-3. 뎅게열 바이러스 검출을 위한 표면증강라만분석

뎅게열바이러스의 검출을 위하여 50 nm 금 나노입자(Nanocs Co., New York, NY)를 이용하여 target DNA를 금 입자표면에 고정화된 capture DNA와 hybridization 반응을 통하여 분석하였다. 구체적으로, 금 나노입자는 10 mM PBS 완충용액(0.6 M NaCl, pH 7.4)에 최종 농도가 0.3 nM이 되도록 준비하였다. 준비된 금 나노입자에 thiol 작용기가 결합된 뎅게열 바이러스 serotype 2의 capture DNA (Operon Biotechnologies, Huntsville, AL)를 결합시킨다. 금 나노입자의 표면에 비 특이적(non-specific binding) 결합을 방지하기 위하여 300 M 6-mercapto-1-hexanol (MCH)를 이용하여 금 나노입자의 표면처리를 하였다. 최종적으로, SERS-active dye인 TAMRA가 결합된 target DNA ((TAMRA) 5'-TCT AGT CCT TCC AGT GAG ACT ACA GCT TCA TCT CAC CTT G-3')를 금 나노입자 표면에 고정되어 있는 capture DNA와 hybridization을 통해 결합하였다. 이렇게 준비된 금 나노입자를 나노필터소자에 주입하여 필터링존(filtering zone)에 농축된 TAMRA 신호를 Raman 분광기를 이용하여 분석하였다. 라만 분석(NT-MDT spectra, Russia)은 633 nm 레이저를 1 mW power로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

화학적, 생물학적 입자의 분리 및 분석을 위해 미세유체시스템을 적용하는 것은 적은 시료만으로도 빠른 시간 안에 분석 및 측정이 가능하다는 장점을 갖는다. 향후 이러한 마이크로 플루이드크(microfluidics)를 기반으로 한 전처리 기술들은 기존의 많은 연구가 진행되어 온 분석기술들과 결합되어 통합분석시스템 및 랩온어칩의 구현에 실질적인 도움을 줄 수 있을 것이다[9,10]. 이러한 필요에 따라 본 연구에서는 통합분석시스템의 적용을 위한 나노수준의 분리 및 농축이 가능한 나노필터소자를 구현하였다. 그림 1a에서는 최종적으로 집적된 나노필터소자(assembled nanofilter device)의 앞면과 뒷면의 사진을 보여주고 있다. 본 소자는 크게 위, 아래로 유체의 흐름이 가능한 미세유체채널이 패터닝된 PDMS와 20 nm 크기의 다공을 갖는 AAO 막으로 구성되어 있다. Fig. 1(b)에서 보는 바와 같이 AAO 막을 사이에 두고, 시료의 주입이 가능한 위쪽의 PDMS 유체채널이 패터닝되어 있으며, 아래쪽의 PDMS 채널로는 AAO 막을 통해 나노입자 및 표지물질이 분리되어 용액의 용출이 가능한 미세채널로 제작되었다. 최종적으로, 위와 아래로 아크릴레이트 기판을 집적하여 나노필터소자가 안정적으로 구동될 수 있도록 지지체 역할을 할 수 있도록 고정하여 나노필터소자를 완성하였다.

3-1. 나노필터소자를 이용한 농축특성분석결과

본 연구에서 개발된 나노필터소자는 Fig. 2(a)에서 보는 바와 같이 미세유체의 유속을 조절할 수 있는 실린지 펌프, 나노입자의 형광 및 라만분석이 가능한 분광시스템이 결합되어 있는 현미경위에 나노필터소자를 올려놓고 분석하였다. 구체적인 나노필터소자의 구동은 위쪽의 PDMS 유체채널의 주입구로 5 $\mu\text{L/s}$ 의 유속으로 FITC 형광물질이 코팅되어 있는 44 nm PS beads를 주입하였다. 이와 동시에 AAO 막의 아래쪽에 결합되어 있는 PDMS 유체채널로는 10 $\mu\text{L/s}$ 의 유속으로 유체를 용출하여 시료가 AAO 막을 통하여 나노입자와 유체가 분리되어 농축될 수 있도록 시스템을 구동하였다. 위쪽의 PDMS 유체채널과 아래쪽의 PDMS 유체채널이 접치는 구간인 필터존(filter zone)에서는 20 nm 크기의 AAO 기공을 통하여 유체와 나노입자가 분리 및 농축되는 현상이 관찰되었다. Fig. 2(b)에서 보는 바와 같이 국부적인 필터존에서 나노입자 또는 표지물질을 선택적으로 분리 및 농축할 수 있다. 본 실험에서는 FITC 형광물질이 코팅되어 있는 44 nm PS beads를 주입하여 시간변화에 따른 분리 및 농축

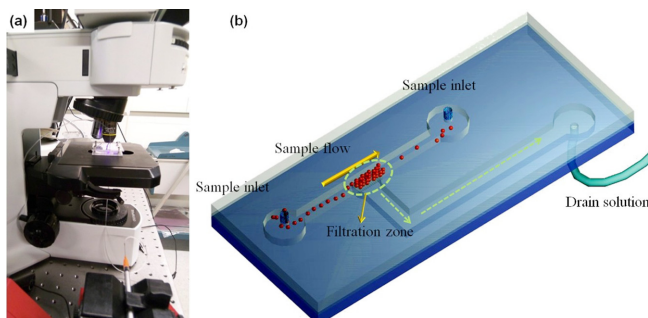


Fig. 2. (a) Photo-image of experimental setup used the nanofilter device, (b) Schematic illustration of nanofiltration process for the separation and concentration of nanoparticles and bio-molecules at the filter zone.

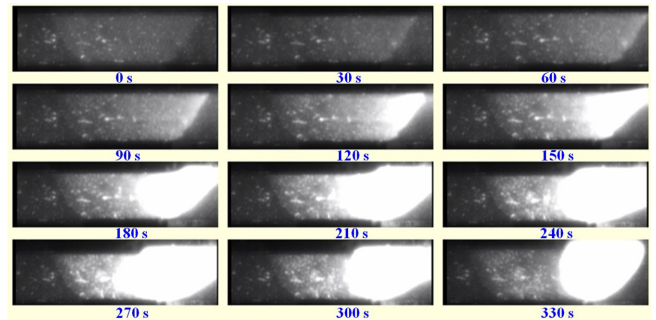


Fig. 3. Time-lapse captured concentration images of 44 nm fluorescent PS particles in the filtration zone bulk.

효율을 관찰하였다(Fig. 3). Fig. 3은 시간변화(0~330 s)에 따라 필터존에서 PS beads가 농축되는 현상을 실시간으로 분석하였다. 예상한 바와 같이 20 nm 크기의 기공이 있는 AAO 막을 44 nm 크기의 PS beads는 통과하지 못하고 위쪽의 PDMS 필터존에 분리 및 농축되는 현상이 관찰되었다. 본 연구결과를 통해 수십 나노크기의 나노입자 및 물질을 수분 내에 효과적으로 분리 및 농축이 가능한 나노필터소자임을 확인할 수 있었다.

3-2. 표면증강라만분석기술을 이용한 뎅기열바이러스 검출연구

위의 PS beads 분리 및 농축효율 실험을 통해 나노필터소자의 성능이 검증된 바와 같이 수십 나노수준의 나노입자 및 표지물질을 신속하면서도 선택적으로 분리 및 농축할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 소자의 특성을 이용하여, 뎅기열바이러스의 표면증강라만검출연구를 수행하였다.

본 실험에서 표지물질로 선정한 뎅기 바이러스는 네 가지 혈청형(serotype)이 존재한다. 뎅기열은 뎅기열 바이러스에 감염된 사람을 물었던 모기가 다른 사람을 무는 과정에서 옮겨져 생기는 병으로 고열을 동반하는 급성 열성 질환이다. 또한, 뎅기 출혈 열은 몸에서의 출혈 현상뿐만 아니라 혈압이 떨어지고 다른 장기들의 기능이 저하되는 현상이 생겨 환자가 사망에 이를 수도 있는 바이러스성 질환이다. 본 연구에서는 뎅기열 바이러스의 두 번째 혈청형(serotype II)을 선정하여 표면증강라만검출연구에 적용하였다[11,12].

표면증강라만산란은 금속나노구조에 분자가 접촉하고 있는 경우에 그 분자의 라만신호가 금속의 영향을 받아서 크게 증폭되는 현상을 이용한 것으로 기존의 라만분광법에 비해 $10^5 \sim 10^6$ 정도의 신호증폭 효과를 얻을 수 있어 2000년대 들어 생체물질 검출에 활발히 응용되어지고 있다. 금속표면에 부착된 분자의 라만신호를 효과적으로 증폭하기 위해서는 나노입자의 크기 및 거칠기 등의 조절이 중요한 인자로 작용하게 된다[13-15]. 본 연구에서는 50 nm 크기의 금 나노입자를 선정하였고, 입자의 표면 거칠기를 조절하기 위하여 나노입자들이 필터존에서 모이는 과정에서 서로 뭉침 효과(aggregation effect)를 이용하였다. 나노입자들이 필터존에 선택적으로 모이게 되면서, 입자들은 서로 근접하게 접촉하게 되면서 날카로운 접촉면을 형성하게 되는데 이러한 부분을 hot-spot이라 부르며 라만신호가 효과적으로 증폭되는 지점이다. 보편적으로 용액 상에 분산된 나노입자를 이용하여 라만신호의 증폭연구를 함에 있어서는 나노입자들의 뭉침 효과를 얻기 위하여 여러 가지 염(NaCl or KCl)들을 도입하여 나노입자들이 서로 뭉치는 효과를 활용한다[16,17]. 본 연구에서는 추가

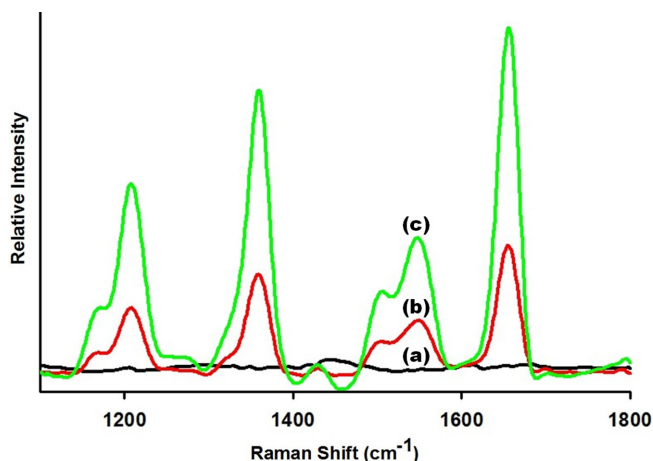


Fig. 4. SERS spectra of TAMRA-labelled dengue virus serotype 2 with increasing the concentration times. (a) 0 s, (b) 150 s, (c) 300 s. The concentration of target DNA was 300 nM.

적인 염(salts)들의 도입 없이, 나노입자가 예측할 수 있는 필터존에 국부적으로 뭉쳐지는 효과를 활용하여 표면증강라만신호를 검출할 수 있었다.

실험부분에서 언급한 바와 같이 TAMRA가 결합된 target DNA를 hybridization을 통해 형성된, 금 나노입자를 미세유체의 주입구로 넣어준다. 0.3 nM의 금 나노입자를 시간변화에 따라 필터존에서 라만 분광신호를 분석하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 시료가 도입되기 전인 초기의 필터존 으로부터는 라만신호가 관측되지 않았다. 150초가 지난 후, 필터존 으로부터 라만신호를 측정 한 결과 Fig. 4(b)에서 보는 바와 같이 TAMRA에 해당하는 라만신호가 관측되었다. 300초가 흐른 후, 다시 필터존에 뭉쳐져 있는 금 나노입자로부터 표면증강라만신호를 검출한 결과 Fig. 4(c)와 같이 약 2배 이상의 라만신호의 강도가 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 본 연구에서 개발한 나노필터소자를 이용하여 저 농도로 존재하는 나노입자를 선택적으로 분리 및 농축을 수행할 수 있었으며, 필터존에서 나노입자의 국부적인 뭉침 효과를 이용하여 표면증강라만신호를 효과적으로 검출할 수 있었다.

4. 결 론

랩온어칩을 구현함에 있어, 미세유체흐름을 기반으로 하는 시료전처리기술개발의 중요성이 더해지는 바이오센서, 바이오칩 분야에 널리 적용 가능한 나노필터소자를 본 연구에서는 구현하였다. 나노수준의 기공을 갖는 AAO 막을 이용하여 미세유체 흐름이 가능한 PDMS 채널을 위, 아래로 집적하여 나노필터소자를 제작하였다. 이렇게 개발된 나노필터소자를 이용하여 44 nm PS beads를 시간변화에 따라 분리 및 농축효율을 분석하였다. 또한, 저 농도 땀기열 바이러스의 신속한 검출을 위하여 나노필터소자에 주입된 시료용액으로부터 50 nm 금 입자만을 선택적으로 분리하고, 필터존에 국부적으로 뭉쳐져 있는 금 나노입자로부터 증폭된 표면증강라만신호를 성공적으로 얻을 수 있었다. 따라서, 본 연구를 통해 개발된 나노필터소자는 향후, 나노입자 및 물질을 선택적으로 분리, 농축할 수 있는 랩온어칩의 시료전처리기술로 활용될 수 있을 것이다. 또한, 신속한 표면증강라만신호 검출결과를 통해, 본 소자가 특정질병 및 표지물질

에 대한 신속하면서도 고감도로 분석할 수 있는 바이오센서 칩으로도 적극 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 논문은 한국기초과학지원연구원의 지원을 받아 수행된 신진우수 연구사업이며 이에 감사 드립니다(K2009B, 허운석).

참고문헌

- Deen, W. M., "Hindered Transport of Large Molecules in Liquid-filled Pores," *AIChE J.*, **33**, 1409-1425(1987).
- Nishizawa, M., Menon, V. P. and Martin, C. R., "Metal Nanotubule Membranes with Electrochemically Switchable Ion-Transport Selectivity," *Science*, **268**, 700-702(1995).
- Jirage, K. B., Hulteen, J. C. and Martin, C. R., "Nanotubule-Based Molecular-Filtration Membranes," *Science*, **278**, 655-658 (1997).
- Che, G., Lakshmi, B. B., Fisher, E. R. and Martin, C. R., "Carbon Nanotubule Membranes for Electrochemical Energy Storage and Production," *Nature*, **393**, 346-349(1998).
- Lee, S. B., Mitchell, D. T., Trofin, L., Nevanen, T. K., Soderlund, H. and Martin, C. R., "Antibody-Based Bio-Nanotube Membranes for Enantiomeric Drug Separations," *Science*, **296**, 2198-2200(2002).
- Fu, J., Mao, P. and Han, J., "Nanofilter Array Chip for Fast Gel-free Biomolecule Separation," *Appl. Phys. Lett.*, **87**, 263902-263902-3(2005).
- Fu, J., Yoo, J. and Han, J., "Molecular Sieving in Periodic Free-Energy Landscapes Created by Patterned Nanofilter Arrays," *Phys. Rev. Lett.*, **97**, 018103-018106(2006).
- Park, S., Huh, Y. S., Craighead, H. G. and Erickson, D., "A Method for Nanofluidic Device Prototyping Using Elastomeric Collapse," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15549-15554(2009).
- Huh, Y. S., Choi, J. H., Park, T. J., Hong, Y. K., Hong, W. H. and Lee, S. Y., "Microfluidic Cell Disruption System Employing a Magnetically Actuated Diaphragm," *Electrophoresis*, **28**, 4748-4757(2007).
- Lee, E. Z., Huh, Y. S., Jun, Y. S., Won, H. J., Hong, Y. K., Park, T. J., Lee, S. Y. and Hong, W. H., "Removal of Bovine Serum Albumin Using Solid-phase Extraction with In-situ Polymerized Stationary Phase in a Microfluidic Device," *J. Chromato. A.*, **1187**, 11-17(2008).
- Zaytseva, N. V., Montagna, R. A., Lee, E. M. and Baeumner, A. J., "Multi-analyte Single-membrane Biosensor for the Serotype-specific Detection of Dengue Virus," *Anal. Bioanal. Chem.*, **380**, 46-53(2004).
- Franz, A. W. E., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z. N., Blair, C. D., Beaty, B. J., James, A. A. and Olson, K. E., "Engineering RNA Interference-based Resistance to Dengue Virus type 2 in Genetically Modified *Aedes Aegypti*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4198-4203(2006).
- Lowe, A. J., Huh, Y. S., Strickland, A. D., Erickson, D. and Batt, C. A., "Multiplex Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Utilizing Ligase Detection Reaction Coupled Surface Enhanced Raman Spectroscopy," *Anal. Chem.*, **82**, 5810-5814(2010).
- Brown, R., Smith, W. E. and Graham, D., "Synthesis of a Ben-

- zotriazole Phosphoramidite for Attachment of Oligonucleotides to Metal Surfaces," *Tetrahedron Lett.*, **42**, 2197-2200(2001).
15. Cao, Y. C., Jin, R. and Mirkin, C. A., "Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection," *Science*, **297**, 1536-1540(2002).
16. Huh, Y. S., Chung, A. J., Cordovez, B. and Erickson, D., "Enhanced on-chip SERS Based Biomolecular Detection Using Electrokinetically Active Microwells," *Lab Chip*, **9**, 433-439(2009).
17. Abu-Hatab, N. A., John, J. F., Oran, J. M. and Sepaniak, M. J., "Multiplexed Microfluidic Surface-Enhanced Raman Spectroscopy," *Appl. Spectrosc.*, **61**, 1116-1122(2007).