

초소형 면역 분석기용 이차원적 배열형 마이크로 우물 제작

이국녕, 안시홍, 박재형, 김용권
 서울대학교 전기공학부

Fabrication of 2-D Microwell Arrays for Micro ELISA System

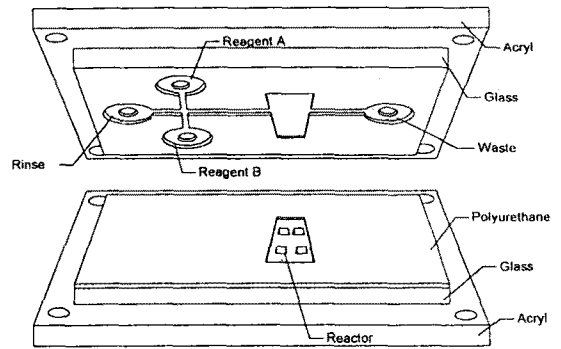
Kook-Nyung Lee, Si-Hong Ahn, Jae-Hyung Park and Yong-Kweon Kim
 School of Electrical Engineering, Seoul National University

Abstract - 2-D microwell arrays for micro ELISA(Enzyme-Linked Immuno Solvent Assay) system were fabricated using micromachining technology. The materials for the bottom plate, top plate and sidewall of the microwell were used a #7740 glass, gold and silicon respectively considering bio-compatibility and easy fabrication. Cylindrical or groove shape microwells, which have about 100 μ m depth and 50~500 μ m diameter or width, were arrayed. The fabricated microwell array can be applied to the essential part of a biochip when surface modification is made to immobilize cells or biomolecules on the microwell bottom.

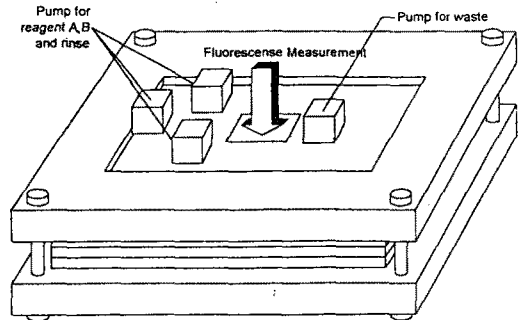
빛을 감지하며 이로써 세포나 DNA를 분석하는 기술과 더불어 초소형 면역 분석기기 제작을 위한 기초 연구로 세포나 DNA를 고정화시킬 수 있는 마이크로 패턴 제작 기술 개발이 필요하다[2]. 마이크로 우물은 표면과 우물 바닥이 단차가 지는 구조로 우물 바닥에만 선택적으로 생체분자나 세포들을 고정화하기가 용이한 구조이다. 또한 세포배양이나 마이크로 분석기기의 반응 용기로서 이용될 수 있다. 본 논문에서는 제작 공정이 비교적 간단하고 대량 생산의 이점이 있는 마이크로머시닝 기술을 이용하여 초소형 면역 분석기의 핵심 부품인 바이오 칩에 이용될 미세 패턴인 마이크로 우물을 제작하였다.

1. 서 론

최근 급속히 발전하는 마이크로머시닝 기술의 도움으로 biotechnology와 이의 응용기술들의 비약적인 발전이 기대되게 되었으며, 여러 가지 다양한 biomedical micro device 개발을 위한 활발한 연구가 이루어지고 있다. 그 중의 한 분야로 연구되는 초소형 면역 분석기(μ -ELISA)는 마이크로 패턴상에 고정시킨 세포나 DNA에 항원-항체 반응을 일으키고 이를 미세 형광 측정방법으로 세포나 DNA를 분석하는 초소형 시스템이다. 그림1은 초소형 면역 분석기기의 개념도를 보여주고 있다. 반응기(Reactor)에 바이오칩이 놓여지게 되고 분석될 시료가 마이크로 펌프에 의해 유체 통로를 따라 반응기(Reactor)로 흘러 들어와 분석이 되며, 분석이 끝난 시료는 Waste로 버려지고 Rinse를 통해 세척이 되는 시스템이다. 이와 같은 초소형 면역 분석기기를 이용하면 항체의 조작, 혼합, 배양 분리 등 생체의 대량 조작이 가능해지고, 광학적 측정 방법에 의해 반응의 시간과 결과를 대량으로 단시간에 처리하는 것이 가능해져서 연구 및 분석 시간이 단축되고, 비용이 절감되며, 신뢰도가 높은 결과를 얻을 수 있을 것으로 보인다[1]. 이처럼 많은 파급효과가 예상되는 초소형 면역 분석기기 개발을 위해서는 다양한 첨단 기술이 필요하다. 마이크로 구조물을 생물학 시스템과 의료용 시스템에 사용하기 위해 소재와 공정의 제한을 극복할 수 있는 마이크로 device 기본 설계, 공정 기술과 마이크로 패턴 표면에 biomolecule을 고정하는 기술, 세포나 DNA에 항원을 부착시키고 형광물질이 부착된 항체와 항원 항체 반응을 일으키게 하는 기술, 그리고 세포나 DNA에서 발광하는



(a)



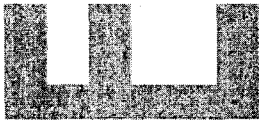
(b)

그림 1. 초소형 면역 분석기기의 개념도

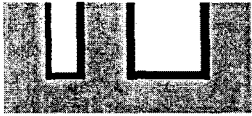
2. 본 론

2.1 마이크로 우물

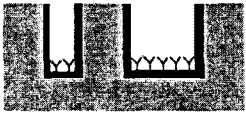
그림 2는 마이크로 우물 바닥 면에만 기능을 도입하여 단백질이나 세포들을 고정화하여 대사 반응이나 진단 시약 등으로 응용되는 바이오칩의 예를 보여주고 있다. 먼저 바닥이 투명한 마이크로 우물을 제작한다(그림 2(a)). 우물의 크기나 깊이는 측정하려는 대상에 따라 달라진다. 제작된 마이크로 우물 벽의 표면 성질을 바꾼다(그림 2(b)). 화학적인 방법에 의하여 마이크로 우물 벽에만 항체등을 고착화 할 수 있도록 한다. 항체를 마이크로 우물 벽에 고착시킨다(그림 2(c)). 측정하려는



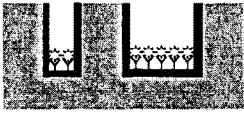
(a)마이크로 우물 제작



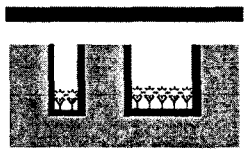
(b)마이크로 우물에 항체 고착을 위한 표면 개질



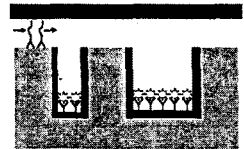
(c)항체 고착



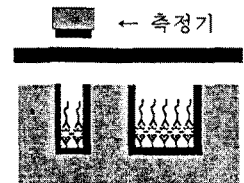
(d)분석할 균 처리



(e)시스템과의 조립



(f)형광체가 붙은 항체 주입



(g) 균 측정

그림 2. 면역 분석 시스템에 사용되는 바이오칩의 원리

균이나 DNA를 가진 시료를 마이크로 우물 위에 처리하여 반응을 일으킨다(그림 2(d)). 반응기를 시스템으로 조립한다(그림 2(e)). 형광체가 붙은 항체를 유체통로

를 통해 주입하여 측정하려는 균이나 DNA와 반응하여 고착화시킨다(그림 2(f)). 고착된 항체에 형광체가 붙어 있어 빛을 가하면 형광을 발하게 되며, 형광양을 측정하여 측정하려는 균이나 DNA의 양을 알 수 있다(그림 2(g)). 초소형 면역 분석기기에서는 세포나 DNA등을 다루기 때문에 마이크로 우물 제작에서는 생체 적합성을 고려한 물질의 선택이 필요하다[3]. 또한 항원 항체 반응을 일으킬 반응기를 마이크로 우물의 안쪽 바닥과 같은 특정한 표면에 고정화하는 작업을 용이하게 하기 위해서 반응기가 도입될 부분은 친수성이 있는 재료로 만들어지는 것이 유리하다. 이를 고려하여 바닥이 유리이고 옆벽이 실리콘으로 된 마이크로 우물을 설계하였다. 마이크로 우물의 바닥이 투명한 유리로 만들어질 경우 우물바닥으로 빛이 투과할 수 있기 때문에 우물 안에서 일어나는 여러 가지 생체반응을 좀더 쉽게 관찰할 수 있는 장점을 가진다. 우물 윗면의 재료로 금을 사용한 이유는 금이 생체에 적합한 재료이면서 동시에 우물바닥이 유리로서 친수성인데 반해 우물 윗면이 금으로 소수성이어서 우물의 바닥과의 차별을 두어 표면 처리를 쉽게 하기 위해서이다. 마이크로 우물의 크기는 대략적으로 평균적 세포의 크기를 고려하여 깊이와 직경이 $100\mu\text{m}$ 정도로 생각할 수 있으나 마이크로 우물 바닥 면에 세포나 단백질을 고정화하는 데 필요한 각종 기능기의 고착화 실험의 편의를 위해 먼저 다양한 크기의 마이크로 우물을 제작하였다.

2.2 제작 공정

그림 3에 마이크로 우물의 제작 공정을 나타내었다. 우물의 바닥으로 사용될 유리를 실리콘과 양극 접합(anodic bonding)한 후 실리콘을 얇게 한다. 실리콘과 #7740 유리기판을 양극 접합할 때 접착력을 좋게 하기 위해 400°C , 800V 조건에서 접합하였다. 실리콘의 두께가 마이크로 우물의 깊이가 되므로 우물의 깊이를 고려하면 실리콘의 thinning 두께를 결정할 수 있다. 실리콘 thinning의 방법에는 CMP(chemical mechanical polishing) 방법과 불산-질산-초산을 적절 한 비율로 혼합한 HNA 용액을 이용하는 습식 식각방법이 모두 사용 가능하다. 그 다음 금속을 증착하며, 이때 금의 접착을 좋게 하기 위해 크롬을 접착층으로 사용하였다. 반응성 이온 식각 시 사용되는 SF_6 가스에 의해 금 박막이 손상되는 것을 방지하기 위해 알루미늄을 Cr/Au 층 위에 추가로 증착하였다. 사진공정으로 마이크로 우물을 패터닝하고 실리콘을 반응성 이온 식각(RIE)으로 남아 있는 실리콘을 비등방 식각하여 바닥이 유리로 된 마이크로 우물 구조물을 얻는다. 반응성 이온 식각으로 하는 건식 식각 이외에 KOH 수용액 등을 이용한 실리콘 비등방 식각을 할 수도 있으나 원통형 구조를 얻기 어렵고, 건식 식각에 비해 수직 한 벽을 얻기에도 불리하다. 또한 건식 식각에 비해 다양한 형태의 정교한 우물 구조를 얻기에 불리하며, 식각 속도에 있어서도 유리한 점이 많지 않다. 실리콘 식각 공정이 끝나고 마이크로 우물 구조가 완성되면 알루미늄을 제거하면 된다.

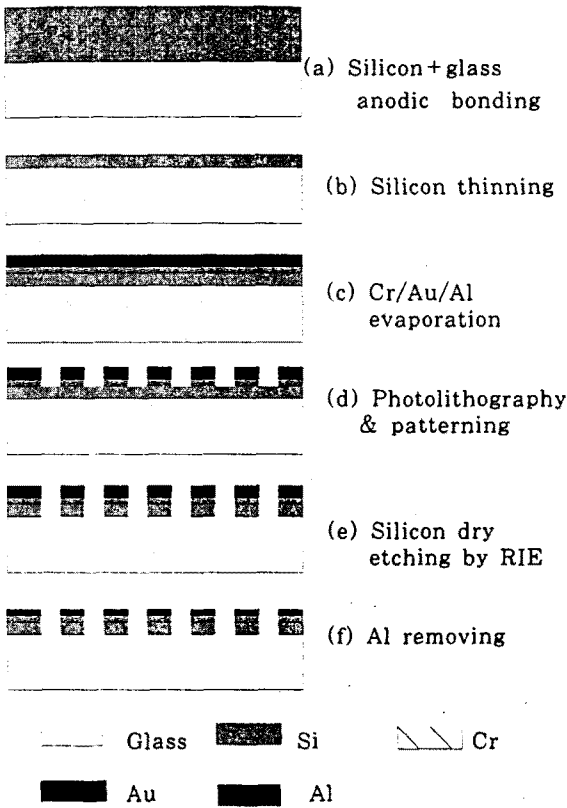


그림 3. 마이크로 우물 제작 공정

2.3 제작된 마이크로 우물

제작한 마이크로 우물의 전자 현미경 사진을 그림 4에서 보였다. 그림 4(a)는 직경이 $100\mu\text{m}$ 이고, 그림 4(b)는 직경이 $500\mu\text{m}$ 이며, 깊이는 각각 $80\mu\text{m}$, $100\mu\text{m}$ 이다. 실리콘을 반응성 이온 식각하는 과정에서 우물 바닥에 발생한 마이크로 grass와 실리콘 잔류물이 관찰되었다.

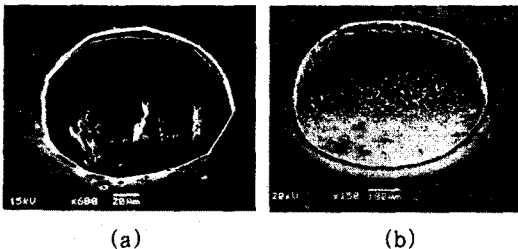


그림 4 실리콘 잔류물이 남아 있는 마이크로 우물

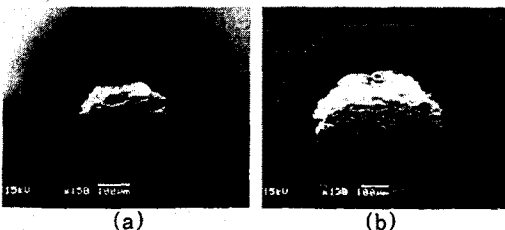


그림 5 실리콘 잔류물이 제거된 마이크로 우물

이를 제거하기 위해 짧은 시간동안 불산(HF)에 넣어 바닥의 유리를 녹여보았다. 그 결과 그림 5에서 볼 수 있듯이 잔류 실리콘이 제거되어 바닥 면이 상당히 향상되었다.

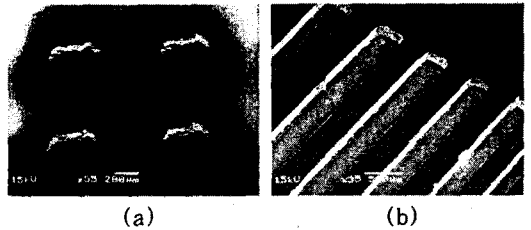


그림 6 제작된 마이크로 우물(원통형(a) 과 홈형(b))

그림 6에 원통형과 홈형으로 제작된 마이크로 우물을 보이고 있다. 홈형 우물의 폭은 $100\sim 400\mu\text{m}$ 이고, 길이는 8mm , 깊이는 $100\mu\text{m}$ 정도이다. 우물 바닥이 유리여서 빛의 투과를 직접 육안으로 확인할 수 있었다.

3. 결 론

본 논문에서는 마이크로머시닝 기술을 이용하여 초소형 면역분석기용 마이크로 우물 array를 제작하였다. 생체나 DNA 등을 다루는 반응기(reaction chamber)로서의 역할을 고려하여 친수성과 생체적합성을 고려하여 실리콘과 유리를 복합한 형태로 제작되었으며 바닥을 유리로 제작하여 위 아래 양방향으로의 관찰을 가능하게 하였다. 마이크로머시닝 기술을 이용하여 필요한 반응기(reaction chamber)를 간단한 방법으로 대량 생산할 수 있는 장점을 살렸으며 기존의 표면처리기술을 그대로 이용할 수 있도록 하였다. 현재 세포나 단백질을 고정화할 수 있는 각종 기능기(functional group)를 우물 바닥에 도입하는 연구와 아울러 이의 측정을 위한 형광측정법에 대한 연구가 진행중이다.

감사의 글

본 연구는 마이크로/나노 시스템 집적화 연구센터의 지원(97K4-0900-00-01-3과제)으로 수행되었습니다.

[참 고 문 헌]

- [1] Rolfe C. Anderson, Gregory J. Bogdan, Zuri Barniv, Timothy D. Dawes, James Winkler, and Kaja Roy, "Microfluidic Biochemical Analysis System". IEEE Transducers '97, Chicago, vol. 1, pp.477-480, 1997
- [2] J. H. Choi, Y. K. Kim, C. Y. Park, J. K. Chang, D. C. Han, "Study on the Fabrication of Micro Patterns for Biosensors and Immobilization of Cells", 대한전기학회 MEMS 연구회 학술발표회 논문집, pp. 273-280, 1997.
- [3] J. K. Chang, C. Y. Park, J. H. Choi, Y. K. Kim, D. C. Han, "Development of Biocompatible Micropatterns for Single Cell Biosensors". Technical Abstracts Digest of BIOS '97 SPIE, p.111, 1997.