

무작위 액중 상호 작용에 의한 단백질칩의 개발

\*최 용성\*, 권 영수\*\*, 박 대희\*

\*원광대학교 전기전자및정보공학부, \*\*동아대학교 전기전자및컴퓨터공학부

Development of Protein Chip by Random Fluidic Self-Assembly Interaction

\*Yong-Sung Choi\*, Young-Soo Kwon\*\*, and Dae-Hee Park\*

\*School of Electrical, Electrical and Information Engineering, Wonkwang University

\*\*Division of Electrical, Electrical and Computer Engineering, Dong-A University

**Abstract** - In this paper, we have been proposed a new method of multichannel biosensor using random fluidic self-assembly. A metal particle and an array was fabricated. Biomaterials were immobilized on the metal particle. The array and the particles were mixed in a buffer solution, and were arranged by self-assembly. A quarter of total Ni dots were covered by the particles. The binding direction of the particles was controllable, and condition of particles was almost with Au surface on top. The particles were successfully arranged on the array. The biomaterial activities were detected by chemiluminescence.

1. 서 론

바이오센서는 생체재료가 갖는 매우 우수한 분자인식 능력을 이용하여 화학물질의 농도를 측정하는 센서이다. 원리적으로는 바이오센서의 채널수를 증가시켜, 집적형으로 하여 측정대상물질의 종류를 늘릴 수 있다. 이렇게 하여 각종 효소기질, 항원, DNA 등을 동시에 측정가능할 뿐만 아니라 냄새나 맛이라는 생물감각기를 구축할 수 있는 가능성도 있다. 이러한 센서의 제작에는 생체재료인 효소나 항체 등의 식별소자의 고정화가 필요하다.

지금까지의 주요한 방법은 다른 종류의 생체재료를 순차적으로 개별로 기관에 배치하여 고정화하였다. 이 방법은 센서의 미소화나 고정화 생체재료의 종류의 증가에 대응하는 것이 곤란하였다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 종류의 생체재료를 동시에 일괄하여 고정화할 수 있는 방법의 개발을 목적으로 하였다. 이 목적을 실현시키기 위하여, 재료의 배치조작으로 자기조립의 수법을 채용하였다. 즉, 배치조작은 대상이 미소하게 되면, 배치시키는 부품과 배치시키는 쪽에 어떤 친화력을 갖게 하고, 이 힘을 이용하여 회합 구축시키는 (자기조립) 것이 효율성이 좋게 된다. 이러한 방법을 이용하여 시스템을 구축한 보고로는 중력, 자기력, 표면장력, 형모관련, 친수성소수성, 정전기력, 생체재료의 특이적 친화력을 이용한 것 등[1-10]이 있다. 한편, 이 중에서 바이오센서의 제작에 이용된 것은 2건뿐이다 [5, 6].

다채널을 실현시키기 위하여 구축의 번잡함을 없애고, 많은 구성요소를 한번에 구축하는 기술이 필요하게 된다. 그래서, 센서의 제작에는 미세한 가공이나 한번에 달은 구성요소를 많이 구축할 수 있는 기술인 미세가공기술을 이용하였다. 이 기술은 반도체산업에서 반도체집적회로 등 많은 전자부품의 제작에 이용되고 있다. 이 기술을 다채널의 집적형센서 구축에 이용하면, 센서채널이 수만단위로 되어도 센서의 측정부분의 크기는 수cm 이내로 미소화할 수 있다.

또한, 지금까지의 미세가공기술이나 자기조립을 이용한 집적화센서의 연구는 검출방법이 광에 의한 것이며, 전기화학적 검출을 한 보고는 없다. 따라서, 본 연구에서 전기화학적 검출도 가능한 집적형 바이오센서를 개발하였다.

2. 실험방법

2.1 서약

Peroxidase (POD: horseradish origin, Wako pure medicine industry)와 glucose oxidase (GOD: Wako Pure Chemical Industries)는 반응의 촉매로서 사용하였다. 효소고정화를 위하여 bead 세척용으로 수산화나트륨을 사용하였다. 효소고정화에는 톨루엔, 글루탈알데히드 (25%), γ-APTES를 사용하였다. 금표면을 세척에 사용하기 위한 아세톤은 전자공업용 (Kanto Chemical Co., Inc.)을 사용하였다. 도금용액은 MICROFAB Ni 100 (Japanese Electroplating Engineers of Japan Ltd.)을 사용하였다. 포토리소그래픽에 사용한 네거티브형 레지스트는 SU-8 50 (MicroChem Corp)을, 그 현상액은 SU-8 Remover (MicroChem Corp)을 사용하였다.포지티브형 레지스트는 PMER P-LA900PM (Tokyo Applied Chemical Industries, Ltd.)을 사용하였다. 그 현상액은 P-7G (Tokyo Applied Chemical Industries, Ltd.)을 사용하였고, 레지스트를 peel off하는 데는 PMER Remover PS (Tokyo applied chemistry industry)를 사용하였다. 센서기관을 제작하기 위하여 두께 1.2~1.5mm, 76x26mm의 MICRO SLIDE GLASS (MATSUNAMI)를 사용하였다. 또한, 화학발광시약으로는 루미놀 (생화학용)을 사용하였고, 촉매가 되는 p-요드페놀, 반응의 산화제로서 과산화수소 (30% 수용액, 생화학용)를 사용하였다.

2.2 시료제작 장치 및 측정장치

기관에 박막을 증착하기 위하여 진공증착장치 (Quick Mini Vacuum System SVC-700Turbo-TM, SANYU)를 사용하였다. photo-fabrication 장치로서, 레지스트를 코팅하기 위한스핀코터 (IH-DXII and MIKASA), bake하기 위한 오븐 (DK300 and YAMATO), 노광하기 위한 마스크얼라이너 (MUB3 and KARI SUSS)를 사용하였다. 유리 bead의 배열확인에 실험현미경 (OPTIHOT-2, Nikon)을 사용하였다. 발광반응을 검출하기 위하여 화학발광검출기 (ARGUS50, HAMAMATSU-PHOTONICS)를 사용하였다. 제작한 시료의 3차원적 형상을 측정하기 위하여 전해방사형주사전자현미경 (S-3500N, Hitachi, Ltd.), 고정밀도 디지털현미경 (VH-6300 and KEYENCE)이 사용되었다.

### 2.3 센서의 제작

집적형바이오센서는 생체재료를 고정할 담체와 이것을 배치하고, 신호를 검출할 기관(어레이)으로 구성되어 있다. 담체의 형상은 직경이 100 $\mu\text{m}$ 로 물에 침전가능하다. 담체는 photo-fabrication에 의하여 제작하였다. 담체는 생체재료로 고정화할 수 있는 층과 affinity를 갖기 위한 층의 구조로 되어 있다. 담체는 도전재료로 하였다. 또한, 어레이의 담체가 배치될 장소도 도전재료로 하여 효소광촉매반응에 의하여 일어나는 형광검출과 산화·환원반응에 의한 전기검출의 복합적 검출을 가능하게 하는 방법을 고려하였다. 생체재료는 고정화할 층이 외측으로 향하여 결합할 필요가 있다. 담체를 기관에 배치시키기 위하여 담체와 기관간의 자기력을 이용하여 방향의 제어 가 가능한 자기조립이 발생하는 구조로 하였다.

#### 2.3.1 센서용 미소담체의 제작

센서용 미세담체의 제작은 기상성장인 증착장치를 사용하였고, 1 $\mu\text{m}$  이하 두께의 담체를 제작할 수 있었다. 유리기관을 초음파세척기로 순수, isopropyl-alcohol (IPA), 아세톤, IPA, 초순수의 순서로 각각 5분씩 하였다. 이 기관에 Cr 200Å, Al 4000Å이 증착되었다. 네거티브형 레지스트인 SU-8을 사용하여 레지스트 패턴을 제작하였다. 제작된 레지스트패턴에 Ni 4000Å, Ti 200Å, Au 2000Å을 증착하였다. 마지막으로 80~85 $^{\circ}\text{C}$ 에서 기관을 SU-8 REMOVER에 10분간 담구어 레지스트를 peel off 하였다. 희생층인 Al층을 에칭함으로써 담체를 제작하였다.

#### 2.3.2 유리 bead 담체에 효소의 고정화

직경 100 $\mu\text{m}$ 의 유리 bead를 아세톤에 담구어 20분간 각반하여 세척하였다. 이 담체의 금표면에 티올결합에 의하여 카르복실기를 수식하기 위하여 100 $\mu\text{M}$ 의 3-carboxy propylidissulfide (3-CPD) ethanol 용액중에 30분간 담구어 각반하였다. 그후 ethanol에 의한 세척을 2회하였다. 카르복실기를 활성화시키기 위하여 25mg의 수용액카르보디이미드 (EDC)와 15mg의 N-hydroxysuccin imide (NHS)를 10ml의 90%, 1,4Dioxane에 용해한 것에 담구어 각반하였다. 종료후 동량의 증류수로 5분간 각반하고, 그후 증류수로 2회 세척하였다. POD 1mg을 pH8.0, 1mM의 인산완충액 1ml중에 녹여서 담체를 12시간 담구어 효소를 고정화하였다.

#### 2.3.3 Ni dot 어레이의 제작

기관의 세척, 전극제작을 위한 Cr과 Au의 증착, 도금형틀 제작을 위한 photolithography는 기상성장법에 의한 센서용 미소담체의 제작과 동일 조건이다. 유리기관상에 Cr과 Au를 증착하고, 포지티브 레지스트인 OFPR을 코팅하여 photolithography에 의하여 Cr과 Au를 에칭하였다. 또한, 네거티브 레지스트인 SU-8을 코팅하여 photolithography에 의하여 에칭하였다. Ni를 도금한 후, 기관상을 2400의 사포를 사용하여 연마하고, 알루미늄을 사용하여 마무리하여 기관표면을 매끄럽게 하였다. Ni 도금의 조건은 온도 : 50 (50~60) $^{\circ}\text{C}$ , 전류밀도 : 3 (2~5) A/cm<sup>2</sup>, pH : 4.0 (3.5~4.5), 양극 : Ni anode로 하였다. 식출속도는 1.6  $\mu\text{m}/\text{min}$ 이다.

#### 2.3.4 센서 어레이의 제작

담체가 자기력에 의하여 기관에 배치되는가를 검토하였다. 기관의 수평방향과 수직방향에 영구자석을 놓음으로써, 기관측의 Ni패턴을 자화시킨다. 다음으로, 담체는 기관과 물이 있는 샘플튜브에 넣고, 수분간 각반한다. 그후 기관을 샘플튜브에서 내어 건조시킨다. 이 기관을 디지털현미경 및 주사형전자현미경으로 관찰한다. 우선 용액중에서 담체가 자기력에 의하여 배치되는가, 담체의 결합방향의 제어가 가능한가를 조사하였다. 먼저, 자화되지 않은 Ni담체와 자화시킨 기관을 사용하여 담체가

Ni패턴상에 배치되는가를 검토하였다. 직경 200 $\mu\text{m}$ , 두께 1.2 $\mu\text{m}$ 의 담체가 사용되었다. negative control로서 담체와 기관 모두 자화하지 않고 동일 실험을 하였다. 또한, Ni과 Au 2층 구조를 갖는 자화시키지 않은 담체와 Ni패턴을 갖는 기관을 사용하여 담체가 금속을 외측으로 향하여 기관의 Ni패턴에 배치되는가도 검토하였다.

#### 2.4 담체에 고정화한 효소활성의 측정방법

GOD, POD 및 양쪽을 고정화한 3종류의 bead를 준비하였다. p-요드페놀 0.13mM, 루미놀 1mM의 혼합용액중에 기관을 담고 이 기관의 챔버내에 각각의 bead를 넣는다. 발광은 2차원고감도 화학발광계 계측시스템으로 측정하였다.

## 3. 결과 및 검토

### 3.1 미소담체

그림 1 (a)는 제작된 미소담체를 나타낸다. 미소담체는 유리기관상에 Cr과 Al을 증착하고, SU-8을 스핀코팅한 후, 포토그소그래픽으로 에칭하였다. 기관에 Ni, Ti 및 Au층을 전기도금 및 증착하였다. 그리고, SU-8, Ni, Ti 및 Au층을 remove하여, 미소 담체를 얻었다. 그림 1 (b)는 담체입자를 확대한 것으로서, 직경이 8 $\mu\text{m}$ , 두께가 약 1 $\mu\text{m}$ 의 원판상이다. 이 외에도 직경 5 $\mu\text{m}$ ~100 $\mu\text{m}$ 의 미소담체도 제작할 수 있었다.

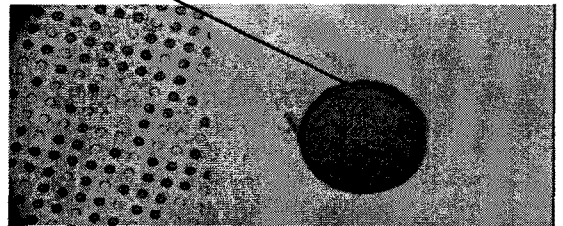


Figure 1. Electroplate metal particles.

### 3.2 Ni dot 어레이

그림 2는 제작된 센서어레이를 나타낸다. 유리기관상에 Cr과 Al을 증착하고, SU-8을 스핀코팅한 후, photolithography로 에칭하였다. 기관에 Ni를 도금하여 Cr/Au/Ni 구조를 얻었다. 마지막으로 Ni 표면을 연마하여 매끄러운 Ni dot를 얻었다. Ni dot의 직경은 8 $\mu\text{m}$ 이다.

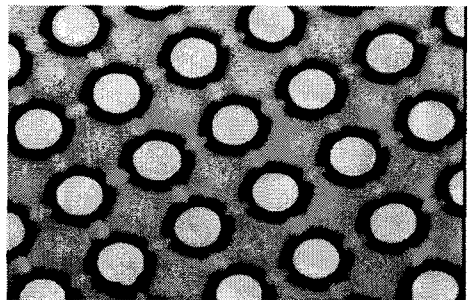
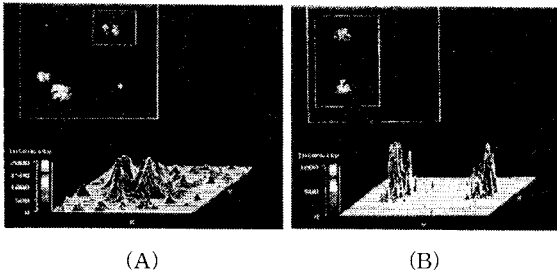


Figure 2. Image of the chip.

### 3.3 효소고정화의 검토

금번에 사용한 생체재료는 효소이며, 고정화에 있어서 고정화량의 표면밀도와 효소의 배향성 등이 중요하다. 즉, 생체재료는 충분한 양이 고정화되지 않으면 실용화에 이용할 수 없다. 또한, 고정화에 의해서 입체구조가 변화하고, 효소로서의 기능이 작용하지 않거나, 배향이 적당하지 않으면 활성부위가 노출되지 않는 상태가 될 수 있다. 이 때문에 본 연구에서는 사용한 효소고정화 담체가 반응촉매로서 이용 가능함을 루미놀발광에 의한

여 검토하였다. 페르옥시다제의 활성의 최적 pH는 6.0~6.5이며, 루미놀의 발광의 최적 pH는 10~11이다. 이 때문에 우선, 사용하는 반응계에서의 최적의 pH를 구하였다. 그림 3은 1mM 루미놀 5ml, 0.13mM 파라요드페놀 1ml, 1mM 과산화수소 0.2ml의 혼합용액중에 페르옥시다제를 고정화한 효소를 넣고, 루미놀발광을 2차원고감도화학발광계측시스템으로 측정된 결과이다. pH7.5, 8.0, 8.5의 3종류를 조사하였다. pH7.5에서 발광은 얻어지지 않았고, pH8.0, 8.5에서 발광이 측정되었으나 pH8.0에서 보다 높은 발광이 얻어졌다. 이 때문에 이후의 루미놀발광을 이용한 실험은 pH8.0에서 실시하였다.



**Figure 3.** Luminescence intensities of HRP-immobilized beads. The reaction solution was a mixture of 1mM luminol, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20mM phosphate buffer pH8.0 (A) or pH8.5 (B).

#### 4. 결 론

본 논문에서는 집적형바이오센서 구축에 있어서 미소담체의 제작, 기관의 제작 및 기관에 미소담체의 배치를 검토하였다. 포토리소그래픽에 의하여 미소담체를 제작하고, 이것을 기관에 배치하였다. 담체의 기관에의 배치는 담체와 기관을 강자성체 재료로 제작하고, 기관측을 자화시킴으로서 실현시켰다. 유리 bead에 티올기와 EDC 및 NHS를 통해서 효소를 고정화할 수 있었다. 또한, 이 고정화된 효소가 촉매반응으로 해서 사용할 수 있음을 루미놀발광에 의하여 확인하였다. 효소 bead를 고정화하고 각각의 센서챔버에 배치하여 반응의 상호작용이 일어나지 않았으므로, 각각 챔버에서 독립된 반응계를 만들 수 있었다. 이것을 집적형바이오센서에 응용할 수 있음을 알았다.

#### 감사의 글

“이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 되었음 (KRF-2002-050-D00004)”

#### [참 고 문 헌]

- [1] T.S. Wilhelm, J.T. Huck, and Whitesides G.M., "Three-Dimensional Mesoscale Self-Assembly", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol.120, pp.8267-8268, 1998.
- [2] A. Terfort, N. Bowden and G. M. Whitesides, "Three-dimensional selfassembly of millimetrescale components", *Nature*, Vol.386, pp.162-164, 1997.
- [3] A.S. Dimitrov and K. Nagayama, "Continuous Convective Assembling of Fine Particles into Two-Dimensional Arrays on Solid Surfaces", *Langmuir*, Vol.12, pp.1303- 1311, 1996.
- [4] C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Music and J.J. Storhoff, "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials", *Nature*, Vol.382, p.607, 1996.
- [5] D.R. Baselt, G.U. Lee, M. Natesan, S.W. Metzger, P.E. Sheehan, R.J. Colton, "A biosensor based on magnetoresistance technology", *Biosen. & Bioelect.*, Vol.13, pp.731-739, 1998.
- [6] K.L. Michael, L.C. Taylor, S.L. Schultz, and D.R. Walt, "Randomly Ordered Addressable High-Density Optical Sensor Array", *Anal. Chem.*, Vol.70, pp.1242-1248, 1998.
- [7] J.J. Lavigne, S. Savoy, M.B. Clevenger, J.E. Ritchie, B. McDoniel, S.J. Yoo, E.V. Anslyn, J.T. McDevitt, J.B. Shear, and D. Neikirk, "Solution-Based Analysis of Multiple Analytes by a Sensor Array: Toward the Development of an A Electronic Tongue", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol.120, pp.6429-6430, 1998.
- [8] S.C. Esener, and D. Hartmann, "DNA ASSISTED MICRO- ASSEMBLY: A HETEROGENEOUS INTEGRATION TECHNOLOGY FOR OPTOELECTRONICS", *Critical Reviews of Optical Science and Technology*, pp.113-140, 1998.
- [9] H.J. Yeh and J.S. Smith, "Fluidic Self-Assembly of Micro-structures and its Application to Integration of GaAs on Si", *Proceeding, IEEE. MEMS*, pp.279-284, 1994.
- [10] H. Ota, T. Araki, M. Takeda, H. Narumiya and T. Ohara, "Assembling Process for Microscopic Components using Magnetic Force", *Proceeding, IEEE, MEMS*, pp.209-213, 1997.