

연속흐름 종합효소연쇄반응칩 제작을 위한 인듐 산화막 전극의 특성분석

정승룡, 이인제, 김준혁, 김한수*, 김재원**, 최영진**, 강치중**, 김용상***
 명지대학교 나노공학과, *두원공과대학, **명지대학교 물리학과, ***명지대학교 전기공학과

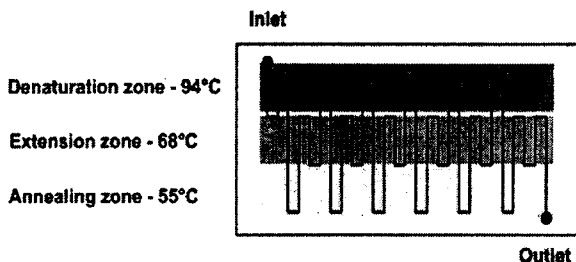
Characteristics of Indium-Tin-Oxide electrode for continuous-flow PCR chip

Seung-Ryong Joung, In-Je Yi, Jun-Hyuk Kim, Han-Soo Kim*, Jaewan Kim**, Y. J. Choi**, C. J. Kang**, Yong-Sang Kim***
 Dept. of Nano Science and Engineering, Myongji University, *Dept. of Electronic Engineering, Doowon Technical College,
 Dept. of Physics, Myongji University, *Dept. of Electrical Engineering, Myongji University

Abstract - PDMS와 ITO 유리를 이용하여 continuous-flow PCR chip을 제작하였다. PDMS를 이용하여 microchannel을 형성하여 주었고, ITO electrode를 heater와 sensor로 사용하기 위하여 반도체 공정을 통해 패턴을 형성하였다. microchannel내에 흐르는 시료의 온도를 제어하기 위하여 heater와 sensor를 calibration을 하였다. ITO heater는 인가된 전압에 대해 매우 선형적인 발열을 하였으며, ITO sensor는 온도에 대해 선형적인 저항 변화를 나타낸 바, 그 결과 continuous-flow PCR chip의 정확한 온도 제어가 가능하였다.

1. 서 론

Polymerase chain reaction (PCR) 기법은 단시간에 DNA를 대량으로 증폭할 수 있는 혁신적인 기술이다. 유전자인 DNA를 합성하는 것은 간단하지 않은데, Mullis에 의해서 개발된 PCR 기법은 polymerase라는 효소를 이용하여 손쉬운 방법으로 DNA 합성할 수 있다. 이런 이유로 PCR은 임상 의학, 범죄학, 생물학, 유전자 해석 등의 넓은 분야에 응용이 가능하다. PCR 반응을 수행하기 위해서는 denaturation, annealing, extension이라 불리는 세 가지의 온도 제어 step이 필요한데, 여기서 온도를 얼마나 정밀하게 제어할 수 있는지가 PCR 실험의 성공여부를 좌우한다. 이러한 요구에 따라 정확하고 대량으로 PCR을 수행할 수 있는 많은 thermocycler들이 개발, 상용화되었다. 그러나 기존의 PCR 장치는 온도를 제어해 주기 위해서 커다란 온도 제어 시스템을 필요로 하고 또 온도를 변화시키는데 있어 많은 시간을 소요하게 된다는 단점을 가진다. 게다가 이러한 느린 온도 ramping은 PCR 반응에서 비 특이적 산물을 생성하여 DNA의 증폭효율을 저하시키기도 한다. 이러한 단점들을 보완하기 위하여 새로운 PCR 장치들에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 새롭고 다양한 형태의 PCR 장치들이 개발되었으나, 근래에 들어서 크게 두 부류의 PCR 장치들이 주류를 이루고 있다. 한 그룹은 static microchamber를 제작하여 microchamber의 온도를 변화시켜주는 방식이고, 나머지 한 그룹은 microchannel을 제작하여 정해진 온도지역을 통과시켜주는 microfluidic system을 이용한 방식이다. 이러한 방식들은 소형화되고 빠른 온도 ramping 능력을 가지므로써 기존의 PCR 장치들이 가지는 문제점들을 해결할 수 있다. 그 중에서도 microfluidic system이 가지는 장점들 때문에 continuous-flow를 이용한 PCR 장치가 각광을 받고 있다. static microchamber 방식은 microchamber의 크기에 의해 시료의 양이 제한을 받게 된다. 그에 반해 continuous-flow PCR 장치는 시료의 양에 제한이 없으며, 여러 종류의 시료에 대하여 연속적인 반응이 가능하기 때문에 continuous-flow PCR 장치가 가지는 가능성은 무한하다. 그림 1은 continuous-flow PCR chip의 개략도이다.



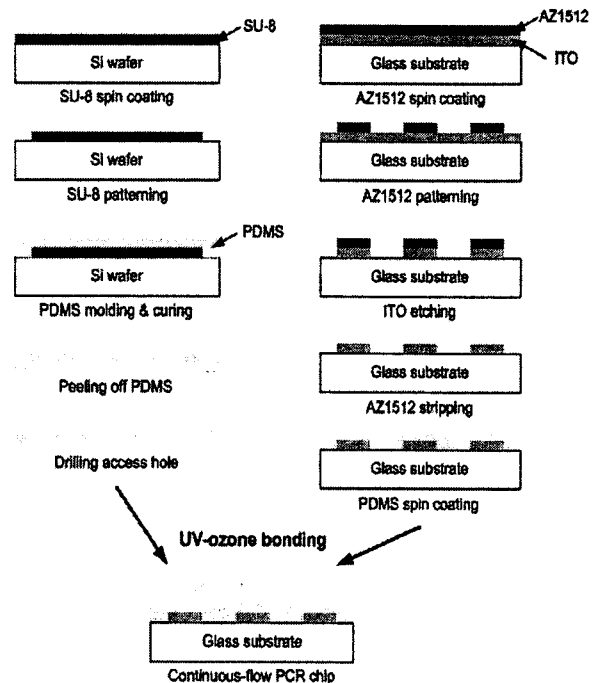
〈그림 1〉 Continuous-flow PCR chip의 개략도

많은 연구자들이 PCR 장치에 관한 연구를 수행하였으나 대부분의 경우 microchannel만을 제작한 뒤 copper block 등을 통한 온도 제어 시스템을 이용하여 PCR을 수행하였다 [1-3]. 그러나 이러한 방식은 기존의 PCR 방식과 같이 커다란 온도 제어 시스템을 필요로 하며 휴대 가능한 PCR의 제작이 어렵다. 최근에 백금 박막의 heater와 sensor를 microchannel chip과 집적시킨 형태의 PCR이 제안되었다 [4,5]. 또한 glass기판에 microchannel을 형성하고 indium

tin oxide (ITO) 박막을 이용하여 heater와 sensor가 집적된 PCR chip을 제작한 결과가 발표되기도 하였다 [6]. 본 연구에서 제안하는 continuous-flow PCR chip도 이와 같은 형태이나 PDMS로 microchannel을 제작하였기 때문에 제조공정이 더 간단하다. Heater와 sensor를 chip에 집적하였기 때문에 휴대 가능한 chip의 제작이 가능하며 ITO 박막이나 polydimethylsiloxane (PDMS)의 투명성으로 인해 실시간 모니터링이나 형광물질 부착을 통한 정량적 측정이 가능하다는 장점을 가진다.

2. 실험방법

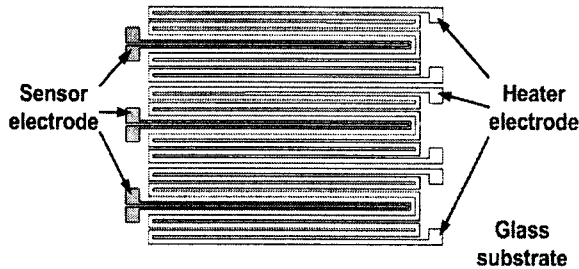
Continuous-flow PCR chip은 두 부분으로 구성되어 있다. 시료가 흘러갈 수 있도록 해주는 PDMS로 된 microchannel과 시료의 온도를 제어하기 위한 ITO electrode가 집적된 glass chip으로 이루어진다. Continuous-flow PCR chip의 제조공정을 그림 2에 나타내었다.



〈그림 2〉 Continuous-flow PCR의 제조공정

PDMS microchannel을 제작하기 위하여 negative molding 방식을 이용하였다. Negative photoresist인 SU-8을 spin coating 방법으로 100 μm 두께로 증착하였다. 사진식각 공정으로 SU-8에 mold 패턴을 형성한 뒤 혼합된 PDMS 용액을 mold에 부어 microchannel을 형성하였다. PDMS를 72 °C에서 5시간 동안 굳힌 후 wafer로부터 PDMS를 제거하여 시료를 주입하기 위한 inlet과 outlet을 형성하였다. 제작된 microchannel의 깊이는 100 μm, 너비는 100 μm, 채널의 cycling 횟수는 30회이며, inlet 부분에 DNA의 변성이 확실하게 일어나게 해주기 위한 initial denaturation step과, 마지막 부분에 비특이적 산물이나 증폭이 미비된 것들의 증폭을 일어나게 해주기 위하여 final extension step을 포함하여 제작하였다. 한 cycle당 denaturation, extension, annealing의 비는 2:3:2 이며 microchannel의 총길이는 2480 mm이다. Heater와 sensor를 만들기 위하여 ITO

박막이 증착된 유리 기판을 사용하였다. 0.7 mm의 유리 기판 위에 180 nm의 ITO 박막이 증착된 면 위에 positive photoresist인 AZ1512를 2 μm 두께를 증착한 뒤, 사진식각 공정을 거쳐 패턴을 형성한 뒤 습식식각 방법으로 ITO electrode 패턴을 형성하였다. 그뒤 photoresist를 제거하여 주고, PDMS를 spin coating 방법으로 증착하여 전기적으로 절연을 시켜주었다. 그림 3은 heater와 sensor의 디자인을 나타내고 있다.



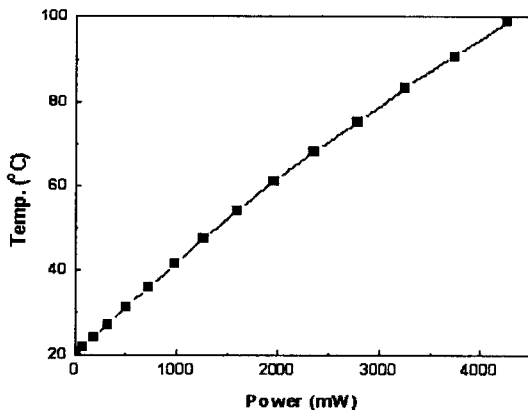
〈그림 3〉 완성된 heater와 sensor 패턴

제작된 heater의 선폭은 1 mm이고, 평균 저항은 2.72 k Ω 이다. Sensor의 선폭은 100 μm 이고, 평균 저항은 7.78 k Ω 이다. 제작된 glass chip과 microchannel을 40분간 UV-ozone 처리를 하여 결합시킨 뒤 상온에서 24시간이 지나면 Si-O-Si간의 공유결합을 하여 강한 결합을 한다.

DNA의 증폭을 위해 denaturation, extension, annealing시 필요한 온도를 제어하기 위하여 heater와 sensor의 온도 calibration을 실시하였다. 제작된 ITO heater electrode의 발열 특성을 파악하기 위하여 chamber를 제작하여 인가전력을 변화시켜가며 resistance temperature detector(RTD)를 통해 chamber내의 deionized water(D. I. water)의 온도를 측정하였다. 또한 ITO sensor electrode로 온도를 측정하기 위하여 chamber내의 D. I. water의 온도변화에 대한 ITO sensor electrode의 저항변화를 측정하였다.

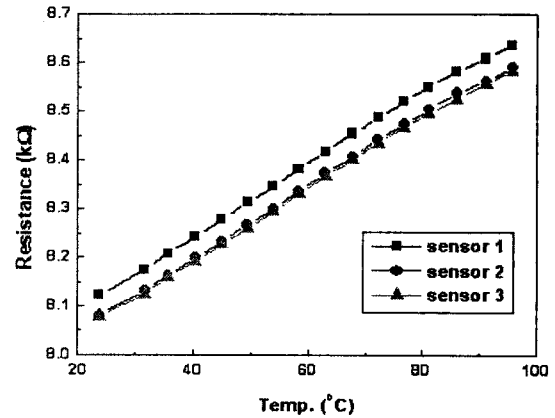
3. 결과 및 토의

ITO heater electrode에 전압을 인가하고 chamber내의 D. I. water의 온도가 saturation될 때까지 시간을 준 뒤 온도를 측정하였다. 그림 4는 인가전력에 따른 chamber의 온도변화를 나타내고 있다.



〈그림 4〉 인가전력에 따른 chamber의 온도변화

ITO heater는 인가된 전력에 대하여 매우 선형적인 온도 변화를 관찰할 수 있었다. 약 4000 mW의 전압을 인가할 때 PCR에 필요한 가장 높은 온도영역인 약 94 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도를 얻을 수 있었다. 각각의 온도 측정을 위하여 제작된 sensor electrode들은 온도변화에 대하여 선형적인 저항변화를 나타내었다. 그림 5는 각각의 sensor들의 저항변화를 나타낸다.



〈그림 5〉 온도에 따른 sensor의 저항 변화

sensor의 제작 과정으로 인해 약간의 초기값의 편차가 있었으나 저항의 변화는 모두 약 7.1 $\Omega/^{\circ}\text{C}$ 정도로 일정하였다. PCR의 성공여부와 성능을 좌우하는 가장 중요한 요인인 온도의 제어를 위하여 1 $^{\circ}\text{C}$ 정도의 온도 제어 능력이 필요한데 이러한 ITO electrode들의 선형적인 발열특성이나 온도에 대한 선형적인 저항변화 특성은 continuous-flow PCR chip의 정확한 온도제어를 가능하게 한다.

4. 결 론

Continuous-flow PCR chip을 제작하여 DNA 증폭을 시키기 위하여 성공적인 온도 제어를 하였다. 본 연구에서 제안하는 continuous-flow PCR chip은 여러 가지 장점을 가진다. PDMS와 glass기판, ITO electrode를 사용하였기 때문에 실시간 모니터링이나 형광물질 부착을 통한 정량적인 분석이 가능하다. 또한 heater와 sensor를 집적하였기 때문에 휴대가 가능한 device를 제작할 수 있으므로 현장에서 바로 PCR 실험을 할 수 있다는 장점을 가진다. 또한 이러한 continuous-flow PCR chip은 'Lab-on-a-chip'이나 micro total analysis system (μ -TAS)등의 시스템 등에 이용될 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 2단계 두뇌한국21사업에 의하여 지원되었음

[참 고 문 헌]

- [1] Martin U. Kopp, Andrew J. de Mello, Andreas Manz, "Chemical amplification : continuous-flow PCR on a chip", Science vol. 280, pp. 1046-1047, 1998.
- [2] Ivonne schneegaß, Reiner Brautigam and Johann Michael Kohler, "Miniaturized flow-through PCR with different template types in a silicon chip thermocycler", Lab on a chip vol. 1, pp. 42-49, 2001.
- [3] Jeong Ah Kim, Ji Youn Lee, Shimyoung Seong, Seung Hwan Cha, Seung Hwan Lee, Jae Jeong Kim, Tai Hyun Park, "Fabrication and characterization of a PDMS-glass hybrid continuous-flow PCR chip, Biochemical Engineering Journal vol. 29, pp. 91-97, 2006.
- [4] T. Fukuba, T. Naganuma and T. Fujii, "Microfabricated flow-through PCR device for in situ gene analysis in extreme environments, MicroTAS, pp. 725-728, 2003.
- [5] Tatsuhiro Fukuba, Takatoki Yamamoto, Takashi Naganuma, Teruo Fujii, "Microfabricated flow-through device for DNA amplification-towards in situ gene analysis" Chemical Engineering Journal vol. 101, pp. 151-156, 2004.
- [6] Kai Sun, Akira Yamaguchi, Yutaka Ishida, Shigeki Matsuo, Hiroaki Misawa, "A heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR", Sensors and Actuators B vol. 84, pp. 283-289, 2002.