

## 자기력에 의한 신규 바이오칩의 개발

최 용성, 문 중대, 이 경섭  
동신대학교 전기공학과

### Development of New Biochip Using Magnetic Force

Yong-Sung Choi, Jong-Dae Moon, and Kyung-Sup Lee  
Department of Electrical Engineering, DongShin University

**Abstract :** This paper describes a new constructing method of multifunctional biosensor using many kinds of biomaterials. A metal particle and an array was fabricated by photolithographic. Biomaterials were immobilized on the metal particle. The array and the particles were mixed in a buffer solution, and were arranged by magnetic force interaction and random fluidic 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 and electrochemical methods.

**Key Words :** Multifunctional biosensor, Biomaterial, Photolithographic, Particle, Array, Self-assembly

## 1. 서 론

서로 다른 생체재료를 각각 담체에 병렬로 고정화하고, 이 담체를 기판에 무작위로 배치하는 방법으로 집적형센서를 구축한 예는 1998년 David 등에 의한 연구보고가 있다 [1-3]. 이들이 미립자의 자기조립화를 이용한 집적형바이오센서의 구축예이다. David 등은 polymethylstyrene-divinylbenzene 비드 (bead)를 배치·고정화하는 곳에 광파이버를 이용하여 센서를 구축하였다. 비드를 배치·고정화하기 위한 홀은 광파이버 끝의 코어를 에칭하여 제작하였다. 비드를 배치·고정화하기 위한 친화력은 비드에 수식된 아미노기와 파이버 사이의 정전기력을 이용하였다. 이 센서의 측정은 배치·고정화한 비드에서의 형광에 의한 검출이다. 이 센서의 특징으로서는 구축시간이 80초로 짧고, 하나의 채널의 직경이 약 300nm로 매우 작다. 이 때문에 집적화가 매우 앞선 센서가 구축되었다. 그러나, 검출방법이 형광검출만으로 한정되어 있다.

따라서, 본 연구는 다종류의 생체재료를 동시에 고정화할 수 있는 방법의 개발과 광과 전기의 복합적인 검출을 할 수 있는 센서를 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이 목적을 실현하기 위하여, 재료의 배치조작에 자기조직화의 방법을 채용하였다. 즉, 배치하는 대상이 미소화되면, 배치시키는 쪽에 어떠한 친화력을 갖게 하고, 이 힘을 이용하여 자기조직화가 효율적으로 되는 것이다. 이와 같은 방법을 이용하여 시스템을 구축한 보고로서는 중력, 표면장력, 친수성, 소수성상호작용, 정전기력 및 생체재료의 특이적 친화력 등이 있다 [4-10]. 식별소자를 고정화하는 담체는 전기화학반응이 가능한 금체담체를 제작하였다. 이 담

체를 기판에 배치하는 데는 자기력에 의한 자기조직화의 방법을 이용하였다. 집적형바이오센서를 구축하기 위하여, 포토리소그래픽 기술, 자기조직화기술을 이용하였다.

## 2. 실 험

### 2.1 시 약

페록사이드 (POD: horseradish origin, Wako pure medicine industry)와 글루코스옥시다제 (GOD: Wako Pure Chemical Industries)는 반응의 촉매로서 사용하였다. 효소고정화를 위하여 비드 세척용으로 수산화나트륨을 사용하였다. 효소고정화에는 톨루엔, 글루탈알데히드 (25%),  $\gamma$ -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 없애기 위하여 PMER Remover PS (Tokyo applied chemistry industry)를 사용하였다.

센서기판을 제작하기 위하여 두께 1.2~1.5mm, 76x26mm의 유리기판 (MATSUNAMI)을 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

기판에 박막을 증착하기 위하여 터보진공증착장치 (Quick Mini Vacuum System SVC-700Turbo-TM, SANYU)를 사용하였다. 미소공정 장치로서, 레지스트를 코팅하기 위한 스피코터 (IH-DXII, MIKASA), 베이크하기 위한 오븐 (DK300, YAMATO), 노광하기 위한 마스크 얼라이너 (MUB3, KARI SUSS)를 사용하였다. 유리 비드의 배열확인에 실험현미경 (OPTIHOT-2, Nikon)을 사용하였다. 발광반응을 검출하기 위하여 화학발광검출기 (ARGUS50, HAMAMATSU-PHOTO NICS)를 사용하였다. 제작한 시료의 3차원적 형상을 측정하기 위하여 전해 방사형주사전자현미경 (S-3500N, Hitachi, Ltd.), 고정밀도 디지털현미경 (VH-6300, KEYENCE)이 사용되었다.

## 2.3 센서의 제작

### 2.3.1 센서용 미소담체의 제작

센서용 미세담체의 제작은 기상성장인 증착장치를 사용하였고, 1 $\mu$ m 이하 두께의 담체를 제작할 수 있었다. 유리 기판을 초음파세척기로 순수, 이소프로필-알콜 (IPA), 아세톤, IPA, 초순수의 순서로 각각 5분씩 하였다. 이 기판에 Cr 200Å, Al 4000Å이 증착되었다. 네거티브형 레지스트인 SU-8 50을 사용하여 레지스트 패턴을 제작하였다. 제작된 레지스트패턴에 Ni 4000Å, Ti 200Å, Au 2000Å을 증착하였다. 마지막으로 80~85°C에서 기판을 SU-8 REMOVER에 10분간 담구어 레지스트를 없앴다. 희생층인 Al층을 에칭함으로써 담체를 제작하였다.

### 2.3.2 유리 bead 담체에 효소의 고정화

직경 100 $\mu$ m의 유리 비드를 아세톤에 담구어 20분간 각반하여 세척하였다. 이 담체의 금표면에 티올결합에 의하여 카르복실기를 수식하기 위하여 100 $\mu$ M의 3-카르복시프로필디설파이드 에탄올 (3-CPD) 용액중에 30분간 담구어 각반하였다. 그후 에탄올에 의한 세척을 2회하였다. 카르복실기를 활성화시키기 위하여 25mg의 수용액카르보디이미드 (EDC)와 15mg의 N-하이드록시석신이미드 (NHS)를 10ml의 90%, 1,4Dioxane에 용해한 것에 담구어 각반하였다. 종료후 동량의 중류수로 5분간 각반하고, 그후 중류수로 2회 세척하였다. POD 1mg을 pH8.0, 1mM의 인산완충액 1ml중에 녹여서 담체를 12시간 담구어 효소를 고정화하였다.

### 2.3.3 Ni 도트 어레이의 제작

기판의 세척, 전극제작을 위한 Cr과 Au의 증착, 도금형틀 제작을 위한 포토리소그래픽은 기상성장법에 의한 센서용 미소담체의 제작과 동일 조건이다. 유리기판상에 Cr과 Au를 증착하고, 포지티브 레지스트인 OFPR을 코팅하여 포토리소그래픽에 의하여 Cr과 Au를 에칭하였다. 또한, 네거티브 레지스트인 SU-8을 코팅하여 포토리소그래

픽에 의하여 에칭하였다. Ni을 도금한 후, 기판상을 2400의 사포를 사용하여 연마하고, 알루미늄을 사용하여 마무리하여 기판표면을 매끄럽게 하였다. Ni 도금의 조건은 온도 : 50 (50~60)°C, 전류밀도 : 3 (2~5) A/cm<sup>2</sup>, pH : 4.0 (3.5~4.5), 양극 : Ni로 하였다. 석출속도는 1.6  $\mu$ m/min이다.

### 2.3.4 센서 어레이의 제작

담체가 자기력에 의하여 기판에 배치되는가를 검토하였다. 기판의 수평방향과 수직방향에 영구자석을 놓음으로써, 기판측의 Ni패턴을 자화시킨다. 다음으로, 담체는 기판과 물이 있는 샘플튜브에 넣고, 수분간 각반한다. 그후 기판을 샘플튜브에서 내어 건조시킨다. 이 기판을 디지털현미경 및 주사형전자현미경으로 관찰한다. 우선 용액중에서 담체가 자기력에 의하여 배치되는가, 담체의 결합방향의 제어가 가능한가를 조사하였다. 먼저, 자화되지 않은 Ni담체와 자화시킨 기판을 사용하여 담체가 Ni패턴상에 배치되는가를 검토하였다. 직경 200 $\mu$ m, 두께 1.2 $\mu$ m의 담체가 사용되었다. 참고로 담체와 기판 모두 자화하지 않고 동일 실험을 하였다. 또한, Ni과 Au 2층 구조를 갖는 자화시키지 않은 담체와 Ni패턴을 갖는 기판을 사용하여 담체가 금속을 외측으로 향하여 기판의 Ni패턴에 배치되는가도 검토하였다.

### 2.3.5 담체에 고정화한 효소활성의 측정방법

GOD, POD 및 양쪽을 고정화한 3종류의 비드를 준비하였다. p-요드페놀 0.13mM, 루미놀 1mM의 혼합용액중에 기판을 담그고 이 기판의 챔버내에 각각의 bead를 넣는다. 발광은 2차원고감도화학발광계측시스템으로 측정하였다.

## 3. 결과 및 검토

### 3.1 미소담체

미소담체는 유리기판상에 Cr과 Al을 증착하고, SU-8을 스피코팅한 후, 포토리소그래픽으로 에칭하였다. 기판에 Ni, Ti 및 Au층을 증착하였다. 그리고, SU-8, Ni, Ti 및 Au층을 제거하여, 미소 담체를 얻었다. 사진 1은 Ni/Ti/Au와 SU-8로 구성된 숫자의 구조를 갖는다. 각종 숫자에 의하여 고정화된 생체재료를 인식할 수 있다. 담체입자의 크기는 200 $\mu$ m×400 $\mu$ m이다. 이 외에도 직경 5 $\mu$ m~100 $\mu$ m의 미소담체도 제작할 수 있었다.

### 3.2 Ni 도트 어레이

사진 1은 제작된 센서어레이를 나타낸다. 유리기판상에 Cr과 Au를 증착하고, SU-8을 스피코팅한 후, 포토리소그래픽으로 에칭하였다. 기판에 Ni을 도금하여 Cr/Au/Ni 구조를 얻었다. 마지막으로 Ni 표면을 연마하여 매끄러운 Ni 도트를 얻었다. Ni 도트의 크기는 200 $\mu$ m×400 $\mu$ m이다. 이 외에도 직경 50 $\mu$ m의 Ni 도트 어레이도 제작할 수 있었다.

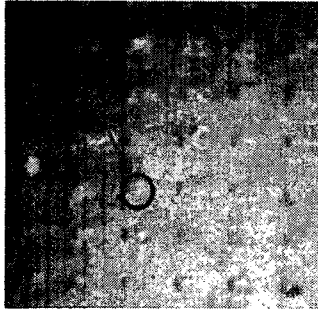


Photo. 1. SEM images of Ni dot. The structure of layer is Cr/Au/Ni.

### 3.3 센서어레이

기관과 물이 든 샘플튜브에 미소담체를 넣고, 약 2분간 각반하였다. 사진 2는 기관을 용액으로부터 내어 건조시킨 후 얻은 디지털현미경으로 찍은 센서어레이를 나타낸다. 사진 2에서 미소담체는 Ni 도트 어레이에 균일하게 결합하고 있지 않다. Ni 패턴상에 결합하고 있는 미소담체수는 79개이며, 이 중에서 미소담체의 금표면이 외측으로 향하여 배치되어 있는 것은 56개로서, 약 71%의 미소담체의 Ni표면이 기관축에 배치되어 있다. 이 실험에서 사용된 미소담체는 Au, Ti, Ni의 3층으로 구성되어 있으며, 각각 1:1:2의 비로서, Ni층이 Au, Ti층에 비하여 자계에 의한 영향을 충분히 받기 쉽도록 되어 있으며, 이 때문에 미소담체가 결합하는 방향제어가 가능하다고 생각한다.

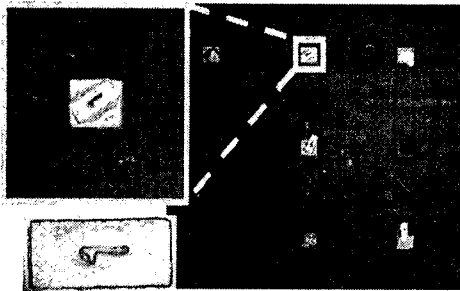
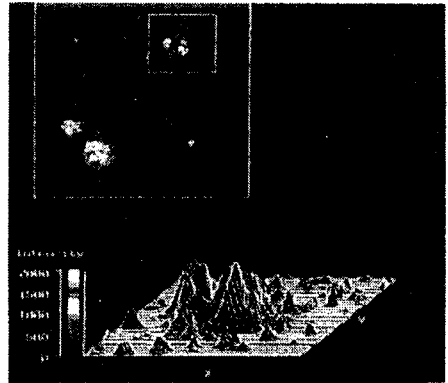


Photo. 2. Digital microscope image of sensor array. The particles arranged on the chip by magnetic force interaction.

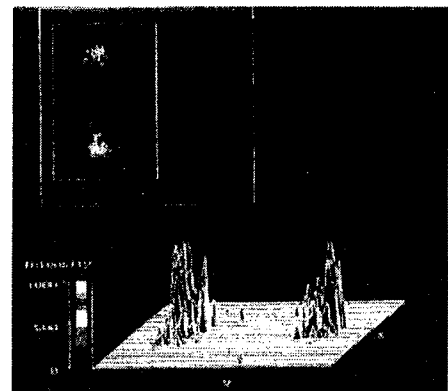
### 3.4 효소고정화의 검토

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 의하여 검토하였다. 페록시다제의 활성의 최적 pH는 6.0~6.5이며, 루미놀의

발광의 최적 pH는 10~11이다. 이 때문에 우선, 사용하는 반응계에서의 최적의 pH를 구하였다. 그림 1은 사진 1의 칩어레이를 사용하여, 1mM 루미놀 5ml, 0.13mM 파라오드페놀 1ml, 1mM 과산화수소 0.2ml의 혼합용액중에 페르옥시다제를 고정화한 효소를 넣고, 루미놀발광을 2차원고감도화학발광계측시스템으로 측정한 결과이다. pH7.5, 8.0, 8.5의 3종류를 조사하였다. pH7.5에서 발광은 일어나지 않았고, pH8.0, 8.5에서 발광이 측정되었으나 pH8.0에서 보다 높은 발광이 일어났다. 이 때문에 이후의 루미놀 발광을 이용한 실험은 pH8.0에서 실시하였다.



(a) pH8.0



(b) pH8.5

Fig. 1. 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.

### 3.5 센서전극에 의한 환원전위측정

그림 2는 제작된 사진 1의 센서어레이를 사용하여 50mM, 100mM인 산완충용액중에 담구고, 100mM의 과산화수소를 40초간격으로 0.5ml씩 가하면서 산화·환원전류값을 클로노암페로메트리로 측정한 결과이다. 이 결과로부터 본 연구에서 제작된 센서칩을 이용하여 과산화수소의 농도측정이 가능함을 알았다. 이 센서칩의 챔버내에서 과산화수소가 생성되는 반응이 일어나면 전기신호로서 검출

될 수 있음을 알았다. 글루코코신 GOD에 의한 촉매반응에서 과산화수소가 생성됨을 알 수 있다. 따라서, GOD를 고정화한 비드를 센서인 챔버내에 배치하면, 글루코코신의 전기화학적 검출이 가능하다.

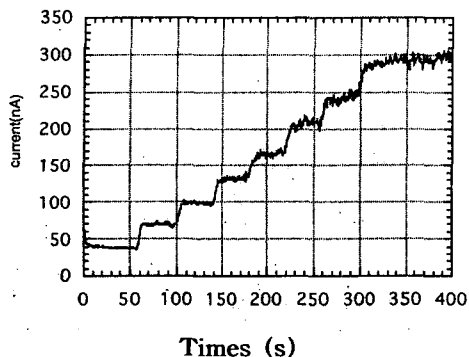


Fig. 2. Electrochemical response curve of the electrode on the chip against the sequential addition of hydrogen peroxide.

#### 4. 결 론

본 논문에서는 집적형바이오센서 구축에 있어서 미소담체의 제작, 기판의 제작 및 기판에 미소담체의 배치를 검토하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 포토리소그래피에 의하여 미소담체를 제작하고, 이것을 기판에 배치하였다.
- 2) 전기화학적 반응을 일으킬 수 있는 담체를 금속으로 하여 센서어레이를 구축하기 위하여, 담체의 기판에의 배치는 담체와 기판을 강자성체 재료로 제작하고, 기판측을 자화시킴으로서 실현시켰다.
- 3) 유리 비드에 티올기와 EDC 및 NHS를 통해서 효소를 고정화할 수 있었다. 또한, 이 고정화된 효소가 촉매반응으로 해서 사용할 수 있음을 루미놀발광에 의하여 확인하였다.
- 4) 효소 비드를 고정화하고 각각의 센서챔버에 배치하여 반응의 상호작용이 일어나지 않았으므로, 각각 챔버에서 독립된 반응체를 만들 수 있었다. 이것을 집적형바이오센서에 응용할 수 있음을 알았다.
- 5) 센서칩의 챔버내에서 과산화수소가 생성되는 반응이 일어나면 전기신호로서 검출될 수 있음을 알았다.

#### 감사의 글

“본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R08-2003-000-10312-0) 지원으로 수행되었음.”

#### 참고 문헌

- [1] David R. Baselt, Gil U. Lee, Mohan Natesan, Steven W. Metzger, Paul E. Sheehan, Richard J. Colton, “A biosensor based on magnetoresistance technology”, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 13, p. 731, 1998.
- [2] Karri L. Michael, Laura C. Taylor, Sandra L. Schultz, and David R. Walt, “Randomly Ordered Addressable High-Density Optical Sensor Array”, *Anal. Chem.*, Vol. 70, p. 1242, 1998.
- [3] A. Terfort, N. Bowden and G.M. Whitesides, “Three-dimensional self-assembly of millimeter-scale components”, *Nature*, Vol. 386, p. 162, 1997.
- [4] A.S. Dimitrov and K. Nagayama, “Continuous Convective Assembling of Fine Particles into Two-Dimensional Arrays on Solid Surfaces”, *Langmuir*, Vol. 12, p. 1303, 1996.
- [5] 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, p. 1242, 1998.
- [6] D.H. Gracias, J. Tien, T.L. Breen, C. Hsu, G.M. Whitesides, “Forming Electrical Networks in Three Dimensions by Self-Assembly”, *Science*, Vol. 289, p. 1170, 2000.
- [7] Y.S. Choi, D.K. Kim and Y.S. Kwon, “Development of a new DNA chip microarray by hydrophobic interaction”, *Colloid and Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspects*, Vol. 201, p. 261, 2002.
- [8] W.T.S. Huck, J. Tien, and G.M. Whitesides, “Three-Dimensional Mesoscale Self-Assembly”, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120, p. 8267, 1998.
- [9] 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 Electronic Tongue”, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120, p. 6429, 1998.
- [10] Y.S. Choi, H.K. Shin, Y.S. Kwon and B.J. Lee, “Fabrication and Organic Response Characteristics of the Copolymer LB Films”, *J. KIEEME*, Vol. 9, p. 180, 1996.