

## 원형 다중전극을 이용한 DNA 조작소자

문상준\* · 윤재영\*\* · 이승섭† · 남홍길\*\* · 지연태\*\*\*

(2002년 8월 1일 접수, 2003년 5월 26일 심사완료)

### Micromachined DNA Manipulation Device Using Circular Multi-Electrodes

Sang Jun. Moon, Jae Young. Yun, Seung S. Lee, Hong Kil. Nam and Yeun Tae. Chi

**Key Words :** Circular Multi-Electrodes(원형 다중전극), DNA Manipulation(DNA 조작), Fluorescence (형광), Micro-Heater(마이크로 히터)

#### Abstract

In this paper, we present a DNA manipulation device in the reaction chamber, which consists of a center electrode and circular outer electrodes of a reaction unit. The charged bio-molecules, DNA, are manipulated by the charge of the electrode in reaction unit. Controlling the induced dynamic electric field between the center electrode and the outer electrodes, concentration / repulsion / manipulation of bio-molecules are enabled at a periphery of electrode. Concentration of the fluorescent DNA at the center electrode is observed by applying +2V. Subsequently, applying -2V, the concentrated DNA is repelled rapidly from the center electrode, which makes dispersion completely in 0.5second. Furthermore, repeated applying +1V/-1V every 5 seconds at each outer electrode, we can circulate the DNA. We also investigate a micro-heater and sensor for DNA manipulation and reaction temperature. The coefficient of heat-resistance and heater temperature characteristic is 0.0043 and 100 °C/sec, respectively.

#### 1. 서론

HGP(Human Genome Project)의 완성 이후 게노믹스(Genomics)와 프로티오믹스(Proteomics) 분야는 유전자 지도와 관련되어 많은 각광을 받게 되었다. 이러한 분야의 주된 연구대상 물질은 양(+) 또는 음(-)의 미세한 전하를 갖는 핵산, 단백질, 항원, 항체와 같은 생물 분자들로, 생물 분자 시료가 가지는 전하의 특성을 이용하여 목적하는 시료에 대한 정보를 얻기 위한 다양한 분석법들이 개발되어 왔다.<sup>(1,2)</sup> 이러한 분석법들에 기초하여 최근 부각하고 있는 MEMS 기술과 더불어 전하를 갖는 생물학적 분자들을 능동적으로 조절하는 방식에

대한 응용이 Micro-TAS(Total Analysis System), LOC(Lab-On-a Chip), Micro-PCR(Polymerase Chain Reaction)과 같은 효율적인 의료진단 및 분자생물학적 분석에 점차 확장되어 적용되고 있다.<sup>(3-6)</sup>

미국의 Nanogen, Inc.의 경우, DNA와 같은 생물학적 분자들의 혼성화(Hybridization) 과정에 전기장을 사용함으로써 DNA-DNA 간의 결합반응을 개선하였다.<sup>(7)</sup> 또한 영국의 University of Wales, Bangor에서는 불 균일한 전기장을 형성하는 AC 전압을 이용하여 생물 분자를 조작하는 방법에 대하여 연구하였다.<sup>(8)</sup> 이러한 기존의 방법들은 단순한 전극의 형상과 개별 전극간의 간섭으로 인하여 생물학적 반응을 독립적으로 조작하기 어렵고, DNA 증폭과 같은 생물학적 반응을 위한 생물 분자의 조작에 한계가 있었던 것이 사실이다.

따라서 본 논문은 PCR 중 주변 전극에서의 반응에 간섭 받지 않고 각각의 전극에서 길이가 다른 DNA를 증폭할 수 있는 능동적인 방법을 제시하고자 한다.

\* 포항공과대학교 대학원 기계산업공학부

† 책임저자, 회원, 포항공과대학교 기계공학과

E-mail : sslee@postech.ac.kr

TEL : (054)279-2183 FAX : (054)279-5899

\*\* 포항공과대학교 대학원 생명과학부

\*\*\* 전남대학교 대학원 유전공학과

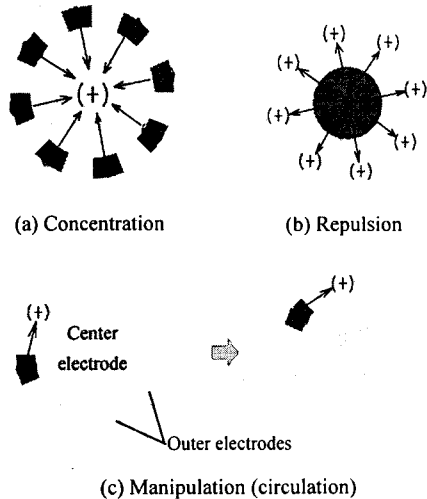


Fig. 1 Principle of DNA manipulation at a reaction unit

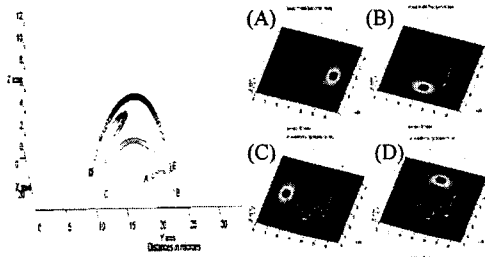


Fig. 2 Simulation result of DNA manipulation at a reaction unit

## 2. 조작 원리 및 장치 구성

본 연구에서는 Fig. 1 과 같이 원형 다중전극으로 구성된 반응부(Reaction unit)의 외곽전극과 중앙전극에 인가되는 동적 전기장을 조절함으로써 전하를 갖는 생물 분자들을 전극주위에 집중(Concentration), 확산(Dispersion), 조작(Manipulation)하여 생물학적 분자들 사이의 상호작용을 조절할 수 있는 DNA 조작소자에 관한 연구를 수행하였다.

Fig. 1(a)에서 외곽전극에 DNA의 전하와 동일한 극성의 (-)전압을 인가하면 (-)전하를 가진 DNA가 원형으로 형성된 전기장에 의하여 중앙전극쪽으로 집중되는 원리를 보여준다. 마찬가지로 반대의 극성을 인가했을 경우 중앙전극의 외부로 DNA 분자가 확산된다. 이러한 원리를 이용하여 외곽전극에 순차적으로 (+)전하와 (-)전하를 회전시켜 인가하면 각각의 전극에서 집중과 확산을 반복하면

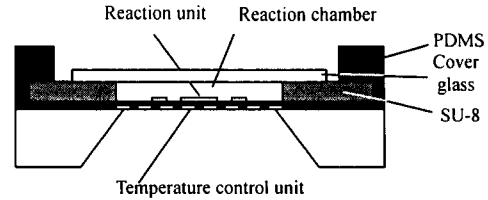


Fig. 3 Schematic view of the DNA manipulation device

서 DNA 분자가 회전하여 중앙전극 주위에만 선택적으로 분포될 수 있다.

반응부 내에서 생물분자의 조작에 관련된 전극의 전하 및 전압 인가 시간과의 상관관계는 Fig. 2와 같은 모의실험을 참조하였다. 모의실험은 인가된 전압과 회전 주파수에 따른 DNA 분자의 이동도(Mobility)를 보여준다. 모의실험에서와 같이 (A)~(D)의 순서로 회전되는 전기장에서 DNA 분자가 전극이 위치한 아래쪽 방향으로 집중된 후 확산하면서 외곽전극을 따라 순차적으로 회전하게 됨을 알 수 있다.

DNA 조작소자의 전체 구성은 Fig. 3과 같이 반응부, 미소 반응용기(Reaction chamber)와 온도 제어부(Temperature control unit)로 구성하였다. DNA와 같은 전하를 가진 생물 분자를 조작하기 위한 반응부는 전기장에 의해 DNA의 분리, 혼합, 결합반응을 유도하며, 미소반응용기는 시료의 투입과 증발을 방지하고 적절한 반응부피를 유지한다. 형성된 반응용기는 덮개 유리(Cover glass)와 고품질의 음성광판재(SU-8)를 사용하였다. 온도제어부는 반응에 필요한 빠른 온도 변화와 적절한 온도의 유지를 위해 박막상에 제작되었으며 일체형의 마이크로 히터와 온도센서를 가지고 있다.

## 3. 제작 공정

반응부의 원형 다중전극은 금(Au)과 SOG(Spin-On-Glass)를 사용해 각각 전극과 절연층을 형성하였다. 산화에 의한 전극의 손실을 방지하기 위해 전극으로 사용된 Au의 두께는 5000Å으로 제작하였으며, 기판과의 접착성 향상을 위해 크롬(Cr) 500Å과 함께 열 증착기(Thermal evaporator)로 각각 증착하였다. 아래 Au 전극 층과 유체의 절연성 향상을 위한 SOG의 두께는 5000Å으로 회전 도포기(Spin Coater)에서 5000rpm으로 회전 도포한 후 80°C-150°C-450°C의 세단계로 경화(Curing)하였다. 절연층의 패턴은 AZ5214를 마스크로 사용하여 건식 식각기(RIE)에서 CF<sub>4</sub> 가스로 5분간

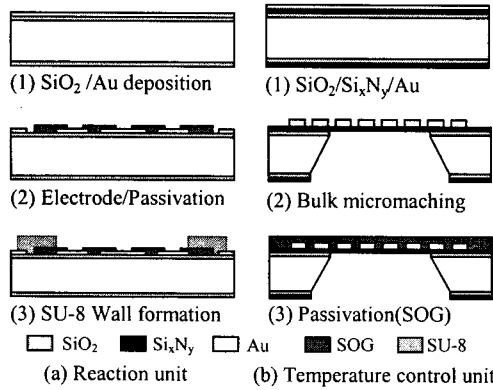


Fig. 4 Fabrication process of the DNA manipulation device

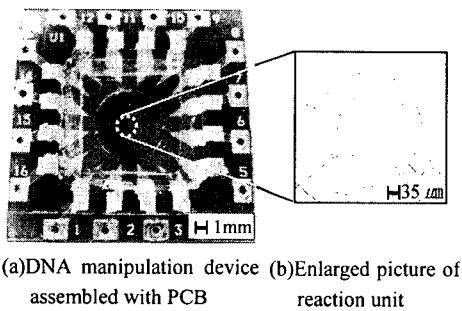


Fig. 5 Fabricated DNA manipulation device

식각(etching)하여 형성하였다. 미소 반응용기는 일정한 반응 부피를 유지하기 위하여 고품비의 음성 감광제(SU-8,50)를 사용하여 100 μm의 높이로 제작되었다.

온도제어부는 빠른 온도변화에 대한 열손실을 줄이기 위하여 저 응력 질화막(Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) 기판을 사용하여 TMAH(Tetra Methyl Ammonium Hydroxide)용액에서 기판 미세 식각(Bulk micro machining)으로 제작하였다. 제작된 질화 박막의 크기는 3×3×0.003mm<sup>3</sup>로 질화 박막 위에 Au를 전열선으로 하는 마이크로 히터와 온도센서가 일체형으로 제작되었다. 온도센서는 RTD(Resistance Temperature Detector)형으로 온도변화에 대한 Au의 저항변화를 검출한다. Fig. 4는 이와 같은 미세공정의 상세도를 나타낸다.

제작된 소자의 전체 크기는 20×20mm<sup>2</sup> 이고 반응부의 지름은 200 μm이다. 공정이 끝난 소자는 Fig. 5와 같이 외부전선의 연결과 반응용액의 투입과 절연을 위하여 PDMS(PolyDiMethylSiloxane)와 PCB(Printed Circuit Board)에 의해 결합된다. 연결된 제작소자는 반응용기에서의 용액증발을 방지하

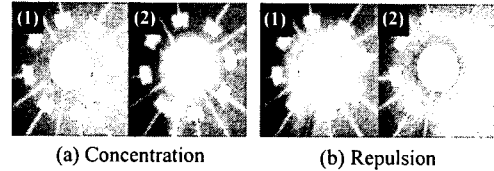


Fig. 6 DNA manipulation results at center electrode (concentration/repulsion)

기 위해 용액을 투입한 후 덮개 유리(Cover glass)가 SU-8으로 이루어진 용기의 상부에 결합된다.

#### 4. 실험 방법 및 결과

##### 4.1 실험 방법

반응부의 중앙전극과 외곽전극에서 전압을 인가하여 DNA 분자의 운동성과 조작성을 실험하였고, 임의 주파수의 전압과 전하량을 임의로 변화시킬 수 있는 가변전압을 인가하기 위해 다채널(Multi-channel) D/A 변환기(National Instruments™, NI6704)로 반응부의 전극과 온도제어부의 히터를 독립적으로 제어하였다. 반응부에서의 DNA 조작실험에서, DNA 분자는 광학현미경에서 직접 관찰될 수 없으므로 형광물질(Cy-5)이 결합된 DNA (5'에 Cy5가 수식된 "5' - Cy5 - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3' " 합성 올리고 뉴클레오타이드)분자와 TBE(Tris-Borate/EDTA)를 혼합하여 미소 반응용기 내에서 움직이는 형광을 촬영하였다. 형광물질이 결합된 DNA의 움직임을 관찰하기 위하여 약한 형광(Fluorescence)을 검출할 수 있는 고감도 CCD 카메라(Rofer Scientific, Cool SNAPx)를 사용하여 촬영하였다. 온도제어부에서 히터의 열 분포 특성과 시정수, 인가 전력과의 관계는 적외선 카메라(ThermaCAM®, PM695)를 사용하여 계측하였고 Au로 제작된 RTD 온도 센서의 저항변화 특성은 반응용기외부에 부착시킨 외부 열전대를 이용하여 측정하였다.

##### 4.2 실험 결과

DNA 분자의 집중(Concentration)과 확산(Repulsion)은 중심전극과 외곽전극에 각각+2~-2V의 전압을 인가하여 관찰하였다. 전극표면에서 TBE 버퍼(Buffer)의 전기분해로 인하여 3V 이상의 전압을 인가하면 거품(Bubble)이 생성되므로 실험을 위해 인가하는 최대 전압은 2V로 제한하였다. 중앙전극에서의 DNA 집중을 위해 외곽전극에 (-)극성을 인가하면 형광물질을 중앙전극방향으로 집중시켜 배경보다 밝은 색의 형광이 나타나는 것을

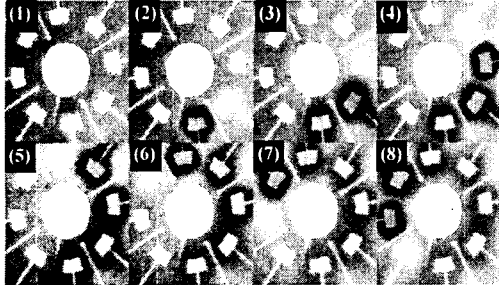


Fig. 7 DNA manipulation results at outer electrodes (circulation)

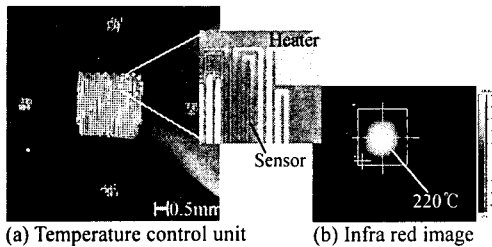


Fig. 8 Temperature control unit and infrared radiation intensity measurement

관찰할 수 있다 Fig. 6(a). 이후 중앙전극에 다시 (-) 극성의 전압을 인가하면 집중되었던 형광물질이 급속히 외곽전극방향으로 반발하기 시작하여 약 0.5 초 후에는 완전히 확산된다. 이러한 확산으로부터 중앙전극부분에 집중되었던 형광물질이 외곽전극으로 재 집중되는 것을 알 수 있다 Fig. 6(b). DNA의 회전조작은 각각의 외곽전극을 따라 반대극성인 +1V/-1V의 전압을 5 초 동안 반복적으로 인가하면서 촬영하였다. Fig. 7에서와 같이 형광물질이 결합된 DNA가 동적전기장에 의해 8개의 외곽전극을 따라 순차적으로 집중 및 반발을 반복하면서 회전함을 확인하였다.

DNA의 이동도(Mobility)를 증가시키기 위해 제한 전압이상으로 전압을 증가시키면 전극표면에서 TBE 버퍼의 전기분해가 발생되지만 외곽전극에 인가되는 전압의 극성변화주기를 빠르게 함으로써 외곽전극에서 일어나는 전기분해를 부분적으로 억제함을 관찰하였다. 따라서 외곽전극의 운동성은 교류(AC)극성을 이용하여 운동성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

Fig. 8(a)는 완성된 온도제어부로서 마이크로 히터와 센서부가 동시에 위치하고 있다. Fig. 8(b)와 같이 적외선 이미지로 촬영된 박막의 온도 분포로부터 박막주위에서 급격한 온도변화가 있는 것을

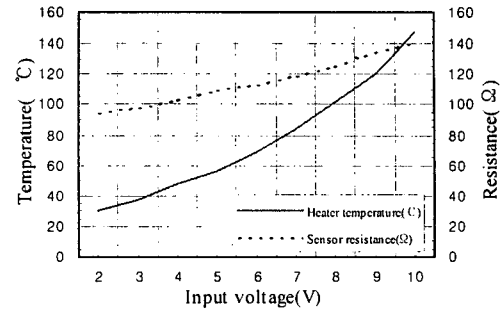


Fig. 9 Measurement result of the heater and temperature sensor characteristic

알 수 있다. 히터의 최대 발열온도는 220°C~320°C이며 최고발열온도 이상에서는 열팽창으로 인하여 Au 박막이 기판으로부터 떨어져 나가는 것이 관찰되었다. 촬영된 열화상과 열전대를 이용하여 측정된 RTD 센서의 온도-저항계수는 0.0043이며, 히터의 소비전력과 온도증가특성은 각각 500 mW와 100°C/sec를 나타내었다 Fig. 9.

## 5. 결론

MEMS 기술을 이용한 미세 전극구조와 미세 반응용기 내에서 생물학적 분자의 조작과 반응제어는 많은 분야에서 응용되고 있다. 특히, 전하를 가진 생물 분자들의 능동적 조작과 반응온도의 제어는 ds-DNA(Double strand DNA)와 단백질의 상호작용 분석, PCR, 제한효소 반응, 재조합 반응 등 분자생물학적 분석과 반응에 이용될 수 있다.

본 연구에서는 기존의 개별 전극으로 DNA를 조작할 경우 발생하는 시료의 확산과 혼합반응을 피하기 위해 단일 반응부내의 시료의 반응조작을 수행하였다. 원형 다중전극에서의 동적 전기장의 조절로 양 또는 음의 전하를 갖는 생물학적 분자를 단일 반응부주위에서 집중, 확산, 조작할 수 있음을 형광을 부착한 DNA를 이용하여 제시하였다.

단일 반응부에서의 DNA 분자의 조작은 반응에 필요한 생물 분자들을 임의의 전극위치에 분포시키고 원형의 다중 전극을 이용하여 전극 주위에서 DNA 및 PCR 생성물의 확산에 의한 간섭을 방지함으로써 분석 감도와 반응특성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 생물학적 반응에 필요한 온도를 조절하기 위한 온도제어부는 저 출력 박막 상에서 마이크로 히터와 센서로 일체화하여 제작하였으며, 생물학적 다중반응에 필요한 열원으로써의 특성과 반응에 필요한 온도를 감지하기 위한 온도-저항특성을 실험하였다.

## 후 기

본 연구는 POSRIP(POSTech Research Initiative Program: Bio-MEMS 기술을 이용한 Protein chip 연구개발)지원사업으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

## 참고문헌

- (1) Maniatis, T., 1989, "Molecular Cloning 2ed.," *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- (2) Nancy, C.S., Soffia, M., John, M.D., Cecilia, G., and Pier, G.R., 2000, "Free Solution Mobility of DNA Molecules Containing Variable Numbers of Cationic Phosphoramidate Internucleoside Linkages," *Journal of Chromato-graphy A*, Vol. 883, pp. 267 ~ 275.
- (3) Northrup, M.A., Gonzalez, C., Hadley, D., Hills, R.F., Landre, P., Lehew, S., Saw, R., Sninsky, J.J., Watson, R., and Watson, R., 1995, "A MEMS Based Miniature DNA Analysis System," *Solid State Sensors and Actuators and Eurosensors IX. Transducers '95. The 8<sup>th</sup> International Conference*, Vol. 1, pp.764 ~ 767.
- (4) Mastrangelo, C.H., Burns, M.A., and Burke, D.T., 1998, "Microfabricated Devices for Genetic Diagnostics," *Invited to proceedings of the IEEE*, pp. 1 ~ 15.
- (5) Torsten, W.L., Xu, X., Miller, C., Wang, L., Edman, C.F., and Nerenberg, M., 2000, "Anchored Multiplex Amplification on a Microelectronic Chip Array," *Nature Biotechnology*, Vol. 18, pp. 199 ~ 204.
- (6) Junquan, X., Lei, W., Zhaohuai, Y., Weiping, Y., Mingxian, H., Jing, C., and Xiao, B.W., 2001, "Micro Total Analysis Systems 2001," *Kluwer academic publishers*, pp. 313 ~ 314.
- (7) Patrick, N.G., David, J.W., Charles, B.F., Patrick, J.D., and Stephen, J.C., 1999, "Single Nucleotide Polymorphic Discrimination by an Electronic Dot Blot Assay on Semiconductor Microchips," *Nature Biotechnology*, Vol. 17, pp. 365 ~ 370.
- (8) Pethig, R., 1996, "Dielectrophoresis: Using Inhomogeneous AC Electrical Fields to Separate and Manipulate Cells," *Crit. Rev. Biotechnol.*, Vol. 16, pp. 331 ~ 348.