# DNA 측정용 SAW 센서의 주파수 증대에 의한 감도향상

Improvement in Sensitivity by Increasing the Frequency of SAW Sensors for DNA Detection

사공정엹\*, 노 용 래\*, 김 재 호\*\*, 이 수 석\*\*\* (Jungyul Sakong\*, Yongrae Roh\*, Jaeho Kim\*\*, Soosuk Lee\*\*\*)

경북대학교 기계공학과\*, 아주대학교 생명분자공학부\*\*, 삼성종합기술원\*\*\* (접수일자: 2006년 11월 17일; 채택일자: 2007년 1월 16일)

본 논문에서는 probe DNA의 고정화 및 probe DNA와 target DNA의 혼성화 반응을 감지할 수 있는 DNA 측정용 고주 파 SAW 센서의 주파수 중대에 따른 감도향상에 대해 연구하였다. 센서는 36° YX LiTaO<sub>3</sub> 압전 단결정 기관위에 Au 박막이 중착된 측정채널 (sensing channel)과 기준채널 (reference channel)로 구성되며 200MHz에서 발진되는 이중 지연선 형태로 제작되었다. 또한 SAW 센서의 감지 미케니즘의 최적화를 위해 SAW 센서의 Au 지연선상의 probe DNA 의 최적 고정화 반응농도와 target DNA의 최적 혼성화 반응농도를 결정하였으며, 디지털 시란지 펌프시스템을 구성하 여 실험자에 따른 오차를 최소화 하였다. 측정채널의 Au 박막 지연선상에 probe DNA를 고정화 시킨 후 target DNA 를 주입하면, DNA의 혼성화 반응이 일어나며 Au 지연선상의 질량이 변하게 된다. 따라서 질량하중 효과에 대한 선서 의 주파수 변화를 측정하였다. 개발된 센서는 최대 0.066ng/ml/Hz의 민감도를 가지며 질량하중 효과에 대한 안정적인 주파수 변화를 나타내었다.

핵심용어: SAW, 오실레이터, DNA 고정화, DNA 혼성화, 질량하중 효과

투고분야: 초음파 및 탄성파분야 (4.6)

In this paper, we have studied improvement in sensitivity by increasing the frequency of SAW sensors for detecting the immobilization and hybridization of DNA. The sensor consists of twin SAW delay lines operating at 200MHz, a sensing channel and a reference channel, fabricated on 36° rotated Y-cut X-propagation LiTaO<sub>3</sub> crystals. The optimum concentration of probe and target DNA was decided for the improvement of detection mechanism, and digital syringe pump system was used to reduce the human errors. The hybridization between immobilized probe DNA and target DNA on the gold-coated delay line results in mass loading on the delay line of the sensing channel. Thus, the relative frequency change was monitored in relation to the mass loading. The measurement results showed a good response of the sensor to the DNA hybridization with a maximum sensitivity level up to 0.066ng/ml/Hz.

Key words: SAW, Oscillator, Oligonucleotide, DNA immobilization, DNA hybridization, Mass loading effect ASK subject classification: Ultrasonic and Elastic Wave (4.6)

## I. 서 론

최근 인간 계놈 프로젝트 (human genome project)등 유전체 연구의 획기적인 잔전에 따라 인간의 질병을 진 단하고 예방하는데 반드시 필요한 바이오센서, 고감도 DNA 센서 기술 개발이 활발하게 진행되고 있다 [1, 2]. 특히 유전자의 역할에 대한 관심이 집중되고 있는 가운 데 특정 DNA 염가서열 분석을 통해 유전적인 질병, 전 염병 등을 진단하고자 하는 연구들이 시도되고 있다.

DNA 측정용 SAW (surface acoustic wave) 센서는 표면탄성파가 입력 IDT와 출력 IDT 사이의 Au 지연선 표면으로 전해질 때, 지연선상의 probe DNA의 고정화 및 probe DNA와 target DNA의 혼성화 반응에 따른 질

책임저자: 노 용 래 (yryong@knu.ac.kr) 702-701 대구시 북구 산격동 1370번지 경북대학교 기계공학부 (전화: 053-950-6828; 팩스: 053-956-9914)

량하중 효과에 의해서 표면탄성파의 전파속도가 변하는 것을 이용해 DNA의 염기서열을 분석할 수 있게 해주는 DNA 센서이다. 이러한 SAW 센서는 기존의 광학분석법 (optical)에 비해 분석단계가 간단하고 신속하게 특정 유 전적 정보를 검출 할 수 있으며 센서의 집적화와 소형화 및 가격의 저렴성 등을 이룰 수 있는 장점을 가지고 있 다 [3]. 따라서 초소형 DNA 센서 개발 및 유전자 공학, 생명공학 등의 DNA 연구 분야에 활발히 사용 되고 있다 [4]. 하지만 기존의 100MHz DNA 측정용 SAW 센서는 광학분석법 (optical)에 비해 감도특성이 다소 떨어진다 는 단점이 있다.

DNA 측정용 SAW센서의 감도특성은 센서의 작동주파 수의 제곱에 비례하며, DNA의 결합 환경, SAW센서 시 스템의 안정화 등의 요소에 의해 결정된다 [5, 6]. 만약 이러한 요소가 개선된다면 SAW 센서의 감도특성을 크 게 개선할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 이전 의 연구 결과를 바탕으로 200MHz로 발진되는 이중 지 연선 형태의 DNA 측정용 고주파 SAW 센서의 제작 및 200MHz SAW 센서 시스템을 구성하였으며, 또한 DNA 의 최적 결합 조건을 결정하여 SAW 센서 감도특성의 개 선방법에 대해 연구하였다 [6].

실험에 사용된 DNA는 합성 올리고뉴클레오티드 (oligonucleotide)이며, DNA 상호간의 혼성화 반응을 감 지하기 위해 probe DNA와 target DNA가 완전한 상보적 (complementary)결합이 가능한 것을 사용하여, DNA의 혼성화 반응에 따른 SAW의 지연선상의 질량의 중가에 의한 주파수 변화를 측정하였다. 이러한 SAW 센서의 주 파수 변화는 DNA의 혼성화 반응 정도를 나타낸다.

본 연구에서는 표면탄성파를 이용하여 DNA의 선택적 인 상보적 결합반응을 측정할 수 있는 200MHz 고주파 DNA 측정용 SAW 센서를 개발하였으며, 제작된 센서를 이용하여 DNA의 상보적 결합 반응 특성에 대한 분석 결 과를 서술하였다. 이 결과에서 나타나듯이 200MHz 고 주파 SAW 센서는 높은 감도 특성을 가지며, DNA의 혼 성화 반응에 대한 변화를 확인할 수 있었다.

#### II. SAW DNA 센서의 구조 및 제작

#### 2.1. SAW 센서의 구조

센서의 전체 구조는 그림 1과 같이 두 개의 개별 SAW 소자가 병렬로 결합한 형태 및 이들을 연결하여 피드백 오실례이션을 시킬 수 있는 오실례이션 회로와 최종 신 호 추출을 위한 로우패스필터 (low pass filter)로 구성 된다. SAW 소자는 LiTaOs 압전 단결정 기판 위에 이중 지연선 형태를 취하여, SAW가 단지 주위환경의 변수에 만 반응하도록 한 기준채널과 주위환경과 특정 측정 변 수에 함께 반응할 수 있도록 한 측정채널로 구성하였다. 그리고 측정채널과 기준채널의 신호 차이를 구함으로써 주위의 온도, 압력 등의 환경 변화반응에 대한 변수를 배재하고, 순수 DNA에만 반응한 신호를 얻을 수 있게 하였다.

SAW DNA 센서의 측정 원리는 그림 2에서와 같이 probe DNA의 고정화 및 probe DNA와 target DNA의 혼성화 반응에 따른 지연선 상의 질량하중 효과에 의해 서 SAW의 전파속도가 변하게 되고, 이 속도의 변화는 다시 피드백 회로로 구성된 오실레이터의 공진 주파수의 변화로 나타나게 된다. 변화된 공진 주파수는 주파수 카 운터기 (PM6669)로 주파수를 카운터 하여 측정한다. 이 때 주파수의 변화량은 흡착된 DNA의 양에 비례하기 때 문에 DNA농도 변화 측정 센서로 작동 된다.



그림 1. DNA 측정용 SAW 센서 구조의 개확도

Fig. 1. Schematic diagram of the DNA SAW sensor.



Decrease in SAW's resonance frequency 그림 2. DNA의 고정화와 훈성화 반응 Fig. 2. Immobilization and hybridization of the DNA.

SAW는 매질의 표면에만 전달하는 탄성파의 일종으로 질량 하중 효과에 아주 민감하게 반응한다. 다음 식 (1) 은 질량하중 효과에 따른 SAW의 전파 속도 변화를 나타 낸 것이다 [5].

$$\frac{\Delta\nu}{\nu_0} = -C_m f_0(\frac{m}{A}) \tag{1}$$

여기서 v<sub>b</sub>는 SAW 초기 전파속도, 소v<sub>b</sub>는 SAW의 속도 변화량, C<sub>m</sub>은 질량 민감 상수 (mass sensitivity coefficient)이고, (m/A)는 단위 면적당 질량의 변화를 나타내며, f<sub>b</sub>는 SAW 소자의 작동 주파수이다. DNA SAW 센서는 이러한 질량 하중 효과를 이용하여 DNA의 선택적인 상보적 결합 반응을 측정한다.

#### 2.2. SAW 센서의 저작

DNA 측정용 200MHz SAW 센서는 반도채 공정을 이 용하여 36°YX LiTaOs 압전기관 위에 IDT (inter-digital transducer) 전극 패턴을 중착하였고, 열중착 (thermal evaporator)를 이용하여 지연선상에 Au 감지막을 증착 시켜 제작하였다. 제작된 SAW 소자는 이중 지연선 형태 의 기준채널과 측정채널이 병렬로 결합된 형태이다. 또 한 SAW 에너지가 지연선 방향으로 집속되도록 하기 위 하여 IDT를 SPUDT (single phase uni- directional transducer)형태로 설계하였다 [7], 제작된 SAW 소자는 먼저 ABS 칩 위에 애폭시 (araldite)를 이용해 고정하고 SAW 센서의 주파수 특성을 향상시키기 위해 폴리머 계 열의 애폭서를 사용하여 입력 IDT에서 발생한 SAW 신 호가 소자의 가장자리의 경계로부터 반사되어 돌아오는 것을 방지하고, LiTaO<sub>3</sub> 내부에서 발생한 벌크파 (bulk wave)에 대한 영향을 최소화하기 위해서 흡수 층을 소 자의 뒷면과 가장자리에 도포하여 이들 파에 대한 간섭 을 최소화 하였다. 이러한 ABS칩 (ABS chip) 형태의



그림 3. 제작된 SAW 센서 Fig. 3. Photograph of a fabricated SAW device.

SAW 센서는 기존의 PCB형태의 SAW 센서에 비해 제작 기간이 짧고 디지털 펌프 시스템에 적용하기 편리하다는 장점이 있다. 그림 3은 이상의 과정을 거쳐 제작된 SAW 센서의 사진이다.

#### 2.3. 센서의 구조 및 제작

기존의 PCB형태의 SAW 센서를 이용한 SAW 센서시 스템은 실험자에 따른 실험 오차가 발생하며, Au 표면으 로의 정확한 양의 DNA 용액 주입 및 제거가 어려웠다. 또한 DNA 용액 주입 시 Au 표면이 공기 중에 노출되기 쉬우며, 장시간 측정 시 발생하는 DNA 용액의 증발 문 제를 해결하기가 어려웠다. 따라서 이러한 단점들을 극 복 할 수 있는 디지털 시린지 펌프 시스템을 그림 4와 같 이 구성하였다. LabVIEW 프로그램을 이용하여 디지털 시린지 펌프를 제어하여 측정 채널과 기준채널에 DNA 용액과 7.4pH PBS 버퍼를 주입하면 이중 지연선 구조 를 가지는 SAW 디바이스의 지연선상에서 질량의 변화 가 일어난다. SAW 센서의 감응된 변화량은 센서에 연결 되어 오실레이터 신호를 주파수 카운터기를 사용하여 측 정 채널과 기준채널에서 각각 카운터 한다. 카운터된 신 호는 GPIB 송수신기를 이용하여 데이터를 PC로 전송하 고, 전송된 데이터는 LabVIEW 프로그램을 이용하여 데 이터를 기록 분석하게 되며, 측정채널과 기준채널의 차 값을 실시간으로 모니터링 할 수 있도록 SAW 센서 시스 템을 구성하였다.



Fig. 4. Digital syringe pump system.

## III. SAW 센서의 감지 미케니즘 최적화

### 3.1. Probe DNA의 최적 농도 결정

제작된 SAW 센서의 감도 향상을 위해 Au 지연선상의 probe DNA의 농도에 따른 최적 고정화 반응 농도와 target DNA의 최적 혼성화 반응 농도를 결정하고자 하

## 표 1. Probe DNA의 농도에 따른 SPR의 angle shift와 saturation time 비교

Table 1. Comparison of the SPR angle shift and saturation time for different probe DNA concentration.

	Angle shift	Saturation time	Time to reach 80% saturation
Mبر 1	0.0359	30 min	17.8 min
5 µM	0.0589	30 miu	13.1 min
Mµ 10	0.1117	30 min	10.1 min
30 µM	0.0441	2 min	1.8 min

였다. 그림 5는 probe DNA의 농도에 따른 Au 표면상의 probe DNA 흡착의 정량적 분석을 위해 SPR을 이용해 공명각 이동 정도를 측정한 것이다. probe DNA의 농도 에 따라 공명각의 이동 정도가 각각 다르게 나타났으며, 최종 측정 공명각은 7.4pH PBS 버퍼용액으로 세척 후 측정하였다. 측정된 결과는 표 1과 같이 probe DNA의 농도가 높아짐에 따라 공명각의 이동도 크게 나타났으며 10µM 일 때 공명각의 이동이 0.1117°로 가장 크게 나타 났다. 하지만 30µM probe DNA에서는 오히려 최종 공 명각의 이동 정도가 낮게 나타났다. 따라서 SAW 센서의



그림 6. 10µM probe DNA에 대한 target DNA의 주입에 따른 센서 주 파수 변화

Fig. 6. Frequency shift in response to the injection of target DNA for 10μM probe DNA.

Au 지연선 상의 최적 probe DNA의 주입농도는 10μM로 결정하였으며, 이를 검중하기 위해 1μM probe DNA와 10μM probe DNA의 2μM target DNA와의 혼성화 반응 정도를 비교 분석하였다. SPR을 이용해 측정한 결과는 10μM probe DNA를 주입했을 때 target DNA에 대한 반응이 가장 높게 나타났다. 그림 6은 SAW 센서 시스템 을 이용하여 측정한 SAW 센서의 주파수 변화특성을 나 타낸 것이다.

#### 3.2. DNA의 고정화 및 혼성화 반응

SAW 센서가 특정 DNA를 검출할 수 있게 하기 위하 여 싸이올 (thiol)이 수식된 probe DNA를 자가조립 단 분자 (self-assembled monolayer, SAM)형성법을 사용 하여 SAW device의 지연선상의 Au 박막 위에 고정화 시켜 그림 7과 같은 순서로 인식층 (recognition layer) 을 형성하고 혼성화 반응을 시켰다.

먼저 지연선 위에 Au 표면을 piranha 용액 (황산:과 산화수소=3:1), 아세톤, 메탄울, 탈이온수의 순서로 깨 끗하게 세척하였다. 그 다음 디지털 시린지 펌프를 구동 하여 마이크로 채널을 통해 말단에 싸이올이 수식된 probe DNA를 Au 표면에 주입하여 반응시켰다. 이상으 로 측정 채널의 Au 표면에 주입하여 반응시켰다. 이상으 로 측정 채널의 Au 표면에 주입하여 반응시켰다. 이상으 다. 혼성화 반응을 시키기 전에 먼저 센서 표면에서 일 어날 수 있는 비 특이적 결합을 방지하기 위해 spacer로 6-mercapto-1-hexanol (MCH)를 반응시킨 후 probe DNA가 고정화된 Au 표면 위에 측정 대상인 target DNA를 주입하였다. 다음으로 PBS 버퍼 (PBS buffer) 용액에 1µM 농도의 target DNA용액을 주입하여 혼성화 반응을 완료시켰다.



그림 7. DNA의 고정화 및 혼성화 반응 과정

Fig. 7. The process of DNA immobilization and hybridization.

## IV. 실험 및 측정

실험은 온도, 압력 등 환경적인 반응 변수를 배제하기 위해 측정채널과 기준채널 두 개를 사용하여 측정된 신 호의 차이 값을 사용하였다. 각각의 SAW 소자의 Au 지 연선위에 디지털 시린지 펌프를 구동하여 20µl PBS 버 퍼 (PBS buffer) 용액을 주입하여 상온에서 약 30분 동 안 오실레이션 신호를 안정화 시켰다. 그림 8은 안정화 된 오실레이션 신호를 나타내며, 측정채널과 기준채널 모두 동일한 PBS 버퍼 (PBS buffer) 용액으로 채워져 있기 때문에 두 SAW 소자가 동일하게 반응한다. 따라서 두 채널의 주파수 차이는 일정하다.

기준채널의 지연선은 단지 주위 환경의 변화에만 반응 하도록 PBS 버퍼 (PBS buffer) 용액이 주입된 상태로 두고, 측정채널의 지연선 상에 probe DNA의 고정화와 target DNA의 농도를 달리하여 반응의 변화를 관찰하였 다. 먼저 디지털 시린지 펌프를 구동하여 측정채널의



그림 8. 측정채널과 기준채널의 주파수 차이 Fig. 8. The deference between the reference and the sensing channels,



표 2. 각 측정 단계별 target DNA 농도 Table 2. Target DNA concentration at each step of the

experiment.

	Target DNA concentration	
Α	9.48 µg/nℓ	
В	23.37 µg/mℓ	
c	46.74 µg/ml	
D	93.48 μg/ml	
E	E 186.96 µg/ml	

PBS 버퍼 (PBS buffer)용액을 제거하고 1μM 농도로 용 해된 probe DNA 20μl를 주입하여 probe DNA를 Au 지 연선 상에 고정시킨 후 표 2와 같이 A (5μM), B(10 μ M), C (20μM), D (40μM)의 순서로 target DNA의 농 도를 변화시켜 DNA의 혼성화 반응을 측정하여 SAW 센 서의 최대 측정범위를 확인하였다.

고정화된 probe DNA와 target DNA가 결합함에 따라 SAW 센서의 지연선상에 질량은 증가하게 되며, SAW의 속도가 감소하여 오실레이션 주파수가 감소하게 된다. 그 결과 그림 9에서 나타나듯이 target DNA의 농도가 증가할수록 주파수 변화가 커짐을 알 수 있었다. 이는 저농도에서 보다 고농도에서 DNA의 질량 하중 효과가 커서 target DNA의 농도가 증가할수록 오실레이션 주파 수가 감소하기 때문이다. 하지만 80µM target DNA를 주입하였을 때는 오히려 주파수의 변화가 감소하였다. 이는 SAW 센서의 Au 지연선상의 probe DNA와 target DNA의 결합이 포화상태에 이르렀기 때문이다. 센서의 감도는 식 (2)를 이용하여 나타내었으며, 10μM probe DNA를 고정하고 10µM target DNA를 고정하였을 때 약 35kHz의 주파수 변화가 나타났다. 최대 감도는 0.066ng/ml/Hz로 1µM probe DNA를 고정화 시켰을 때 감도 0.135ng/ml/Hz 보다 약 2배정도 감도가 향상 되었다.

최대 감도는 0.066ng/ml/Hz를 가지며 target DNA의 질량 하중 효과에 대한 안정된 주파수 변화를 보였다. 이상의 실험 결과로부터 SAW 센서는 DNA의 상보적인 결함에 대해 민감하게 주파수 변화를 보임으로써 SAW 오실레이터 센서가 DNA 센서로 사용 가능함을 확인 할 수 있었다.



## V. 결론

본 연구에서는 36° YX LiTaOs 압전 기판으로 probe DNA의 고정화 및 probe DNA와 target DNA의 혼성화 반응을 감지할 수 있는 고감도 200MHz SAW 센서를 개 발하였다. probe DNA와 target DNA가 서로 혼성화 반 응이 일어남에 따라 변하는 질량 하중 효과에 의해 SAW 의 속도가 변하는 것을 이용하여 이를 주파수 변화로 측 정 할 수 있는 SAW 센서와 SAW 센서 시스템을 구성하 였다. 제작된 센서는 target DNA의 농도변화에 민감하 게 반응하며 안정된 주파수를 나타내었으며, 최대 0.066ng/ml/Hz의 높은 감도 특성을 보였다.

본 연구에서 개발된 SAW DNA 센서는 QCM, PCR, electrochemical 등의 기존 DNA센서보다 높거나 비슷 한 감도를 가지며, 이들 센서보다 장치 및 설비가 간단 하고, 저가에 구현이 가능하며, 별도의 표지가 필요치 않고, 실시간으로 측정 가능함은 물론 반도체 공정을 이 용하여 제작하기 때문에 초소형 센서로 구현 할 수 있는 장점을 가진다 [8-11].

최근 초소형 바이오센서의 개발이 크게 요구되고 있는 가운데 본 연구에서 개발된 고감도 DNA 측정용 고주파 SAW 센서는 이러한 요구에 부합하며, 여러 종류의 인식 층 (recognition layer)을 지연선 상에 고정함으로써 다 양한 염기서열의 DNA를 분석하는데 유용하며, 초소형 DNA 센서 개발 및 유전자 공학, 생명공학 등의 DNA 연 구 분야에 응용 될 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

- B. Lewin, GENS VI, Oxford University Press and Cell Press, pp 89-90, 1994.
- K. Skogerboe, "Molecular Biology Techniques," Anal. Chem. 65, 416-419, 1993.
- T. Nordstorm, M. Ronaghi, L. Forsberg, U. DeFaire, R. Morgenstern and P. Nyren, "Direct analysis of singlenucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing," Biotechnol. Appl. Biochem., 31, 107-112, 2000.
- I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, A. L. Ghindilis and E. Wilkings, "Development of a flow-through immunoassay system," Sensors and Actuators B, 49, 202-210, 1998.
- D. S. Ballantine, R. M. White, S. J. Martin, A. J. Ricco, G. C. Frye, E. T. Zellers and H. Woltjen, *Acoustic Wave Sensors*, (Academic Press) pp 80–82, 1997.
- 허영준, 박유근, 노용래, "DNA 측정용 SH-SAW 센서 개발," 한국음향학 회지, 24 (3) 160-165, 2005. 4.

- 이승희, 노용래, "DART와 EWC/SPUDT형 SAW 필터의 특성 비교," 한 국음황학회지, 18, 53-59, 1999.
- T. Hianik, V. Ostatna, Z. Zajacova, E. Stoikova and G. Evtugn, "Dectection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods," Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15, 291–295, 2005.
- X. Su, Y. J. Wu and W. Knoll, "Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and guartz crystal microbalance techniques for studying DNA," Biosensors and Bioelectronics, 21, 719-726, 2005.
- K. Ikebukuro, Y. Kohiki and K. Sode, "Amperometric DNA sensor using the pyrroquinoline quinine glucose dehydrogenaseavidin conjugate," Biosensors and Bioelectronics, 17, 1075-1080, 2002.
- A. Cox, A. Tilley, F. McOdimba, F. Fyfe, M. Eisler, G. Hide and S. Welburn, "A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood," Experimental Parasitoloty, 111, 24-29, 2005.

#### 저자 약력

#### • 사공경열 (Jungyul Sakong )



2005년 2월: 경북대학교 생물산업기계공학과 졸업 (공학사) 2005년 3월~현재: 경북대학교 기계공학과 석사과정 ※ 주관심분야: 표면탄성과, DNA센서

노용래 (Yongrae Roh)
한국음향학회지 제 20권 제 4호 참조

#### • 김재호 (Jaeho Kim)



1982년: 아주대학교 착학공학과 졸업 (학사) 1989년: University of Nebraska-Lincoln (박사) 1994년~현재: 아주대학교 생명분자공학부 교수

#### 이수석 (Soosuk Lee)



1991년: 포항공과대학교 화학과 품업 (학사) 1993년: 포항공과대학교 학학과 품업 (석사) 1993년: 포항공과대학교 학학과 품업 (박사) 1999년~2000년: McGill University, Organic Chemistry, Post-Doc 2001년~현재: Samsung Advanced Institute of Technology, Bio Lab