

## 마이크로 칩(ATMEGA128)을 이용한 PCR의 온도제어

임기태\*, 박민호\*, 이한별\*, 양기훈\*, 이병성\*, 한다운\*\*, 김용상\*\*\*  
 명지대학교 전기공학과\*, 명지대학교 나노공학과\*\*

### Using the micro-chip (ATMEGA128) for controlling of temperature

Ki-Tae Lim\*, Min-Ho Park\*, Han-Byeol Lee\*, Gi-Hon Yang\*, Byeong-Seong Lee\*, Da-Woon Han\*\*, Young-Sang Kim\*\*\*  
 Dept. of Electrical Engineering, Myoungji University\*, Dept. of Nano & Science Engineering, Myoungji University\*\*

**Abstract** - 본 논문에서는 기존의 PCR 장비가 가지고 있는 낮은 경제성, 장비의 대형화, 긴 분석 시간 등과 같은 단점을 해결하기 위하여 ATMEGA128 마이크로 칩을 사용 continuous-flow PCR 칩의 온도를 제어 하였다. Polydimethylsiloxane (PDMS)와 산화인듐-주석(Indium tin-oxide, ITO) 유리 기판을 사용하여 continuous-flow PCR 칩을 제작하였고 PDMS를 주조 하여 마이크로 채널을 형성하였다. 또한 유리 기판위에 ITO 전극을 패터닝하여 마이크로 히터를 제작하였다. 이 결과 continuous-flow PCR 칩에서 빠르고 정확한 온도 제어를 통한 DNA 증합 효소 연쇄반응 결과를 얻을 수 있었다.

#### 1. 서 론

DNA(deoxyribonucleic acid)의 생물학적 중요성이 증대됨에 따라 DNA의 전기화학적 응용에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.[1] DNA는 돌연변이나 질병 등에 관련된 유전학 연구를 목적으로 하는 DNA chip, DNA 센서 등으로 많이 응용될 뿐 아니라 임상 의학, 법의학, 생물학, 유전자 해석 등과 같이 넓은 분야에 응용되고 있다.[2] 이와 함께 DNA를 대량으로 증폭할 수 있는 polymerase chain reaction (PCR) 기법이 많이 사용되고 있다. PCR 반응을 수행하기 위해서는 변성, 복원, 중합반응이 일어 날 수 있는 세 영역의 온도 제어가 필요로 하는데, 온도 제어의 정밀도에 따라 PCR 성공여부가 정해진다.[3] 그러나 기존의 PCR 장치는 온도를 제어해 주기 위해서 큰 온도 제어 시스템을 필요로 하고 온도를 변화시키는데 많은 시간이 소모된다는 단점을 가지고 있다.[4] 이와 같은 느린 온도 변화는 PCR 반응에서 비 특이적 산물을 생성하여 DNA 증폭효율을 저하시킨다.

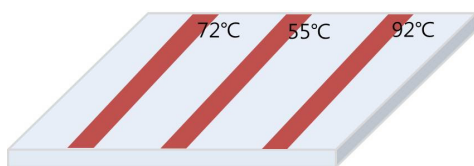
현재 크게 두 종류의 PCR 장비들이 주류를 이루고 있다. Static micro-camber를 제작하여 micro-chamber의 온도를 제어하는 방법과 마이크로 채널을 제작 하여 정해진 온도영역을 통하여 온도제어를 하는 continuous-flow PCR 방법이다. 이러한 방식들은 소형화되고 빠른 온도 변화 능력을 가지고 있기 때문에 기존의 PCR 장비가 가지고 있는 문제를 해결 할 수 있다. 이 중 micro-fluidic 방법은 시료의 양에 제한이 없고 여러 종류의 시료에 대하여 연속적인 반응이 가능하기 때문에 continuous-flow PCR 칩이 더욱더 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 논문에서는 반도체 공정을 이용하여 continuous-flow PCR 칩을 제작하고 ATMEGA128 마이크로 칩을 사용하여 PCR chip의 온도제어를 빠르고 정확하게 하였다. 이를 바탕으로 DNA 증합효소 연쇄반응 실험을 진행하였다.

#### 2. 실험 방법

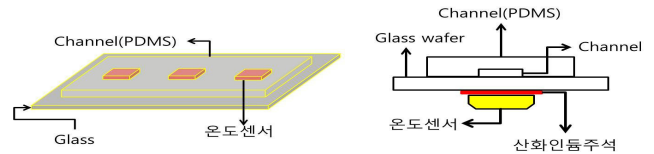
##### 2.1 소자 제작

##### 2.1.1 마이크로 히터 제작

Continuous-flow PCR 칩의 마이크로 히터를 제작하기 위하여 유리 기판위에 ITO 전극을 포토리소그래프 공정을 이용하여 패터닝 하였다. ITO는 증착이 용이하고 투명하며 전도율이 좋은 장점을 가지고



<그림 1> 인듐 주석 산화물(ITO)



<그림 2> PCR 소자 모식도

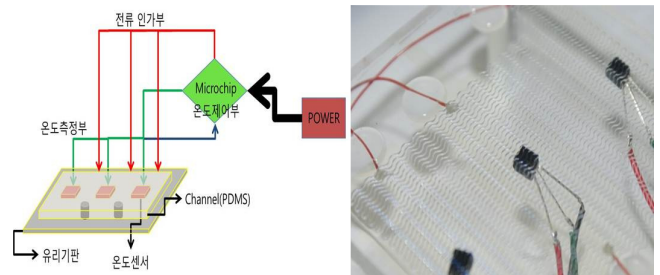
있다. <그림 1>과 같이 제작된 ITO 전극은 각각의 영역마다 92 °C (Denaturation, 변성), 55 °C (Annealing, 복원), 72 °C (Extension, 중합반응) 로 나뉘어져 온도에 따른 PCR 과정을 수행 한다. 그리고 소자의 집적도를 향상시키기 위하여 상온에서의 열전도 효과를 이용하여 쿨러를 대체 하였다.

##### 2.1.2 PCR 소자 제작

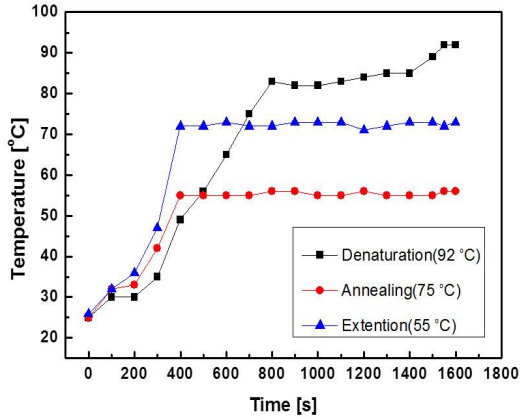
전체적인 소자의 모식도는 <그림 2>와 같다. 소자의 구조가 작고 채널과 채널 사이의 폭이 좁기 때문에 탄력성이 좋은 PDMS를 사용하였다. Sylgard 184와 curing agent를 10대 1로 혼합한 PDMS의 혼합액을 SU-8이 패터닝 된 실리콘 웨이퍼 상에 부어 경화시킴으로써 원하는 PDMS 마이크로 채널을 제작하였다. ITO 전극 패터닝이 형성된 유리 기판 면을 아래 부분으로 하여 전력을 인가하였고, 반대 면은 마이크로 채널을 형성 하였다. 유리 기판과 PDMS 채널은 ozone plasma 표면 처리를 통하여 결합시켰다. 온도 센서는 <그림 2>와 같이 유리 기판 밑 부분의 ITO 상에 부착하여 원하는 온도를 측정 및 제어 할 수 있도록 만들었다. PDMS 안에는 μm 단위의 채널이 형성 되어있으며 이 채널을 통하여 원하는 DNA가 순차적인 온도를 지나면서 변성, 복원, 중합반응을 26 주기 동안 반복하게 된다. 채널의 크기는 높이 200 μm, 폭 500 μm로 제작 되었다.

##### 2.1.3 마이크로 히터 온도 제어

실시간으로 온도를 측정하기 위하여 ITO 전극 패턴에 온도센서를 부착하였다. 온도센서를 부착 한 뒤 온도를 측정하고 측정된 온도를 바탕으로 원하는 온도로 제어한다. DNA가 변성, 복원, 중합반응을 할 수 있도록 각각의 온도를 92 °C (Denaturation), 55 °C (Annealing), 72 °C (Extension)로 나누어 온도를 설정해 주었다. 온도센서 제어는 마이크로 칩(ATmega128)을 사용하여 온도의 측정과 제어를 동시에 수행 할 수 있도록 시스템을 구축하였으며 이에 사용된 마이크로 칩(ATMEGA128)은 -55 °C에서 120 °C 까지 온도 측정이 가능하다. 온도 제어부, 온도 측정부, 전류 인가부로 작업을 세분화 하였다. ITO 전극으로부터 열에



<그림 3> PCR 소자의 전체적인 모식도



〈그림 4〉 마이크로 채널내의 온도변화

너지를 얻기 위하여 온도 측정부에서 측정되고 제어된 결과에 따라 마이크로 칩(전류 인가부)에서 전력을 인가하여 전극의 저항에 따른 열에너지를 얻게 된다. 〈그림 3〉과 같이 ITO 전극 상에 온도센서를 부착하고 온도센서에서 온도를 확인한 후 다시 그 온도를 마이크로 칩에 되돌려 주어 일정온도 이상 넘어지지 않도록 제어한다. 정확한 온도 측정을 위하여 측정하는 시간을 1초 단위로 설정, 실시간으로 온도를 제어할 수 있도록 설계 하였다.

### 3. 결과 및 토의

#### 3.1 온도 측정 결과

완성된 continuous-flow PCR 칩의 온도 제어 결과는 〈그림 4〉에서 보여주고 있다. 실온 25 °C에서 시작하여 시간이 점차 지남에 따라 온도가 서서히 올라가는 것을 확인할 수 있다. 100 초마다 ITO 전극에 인가되는 전류의 양을 증가시켜주었다. 복원 52 °C(Annealing) 영역의 경우 380 초대에 약 335 mA의 전류가 인가되었을 때 가장 빨리 원하는 온도에 도달하였다. 이와 유사하게 복제 72 °C(Extension) 영역 또한 유사한 시간대에 증가하기 시작하여 약 342 mA의 전류가 인가되었을 때 복원 영역 다음으로 원하는 온도에 도달 하는 것을 확인할 수 있다. 마지막으로 변성 92 °C(Denaturation) 영역의 온도가 가장 늦게 목표치에 도달 하였다. 약 265 mA의 전류만으로 1550 초에 변성 영역의 온도에 도달 하는 것을 확인할 수 있다.

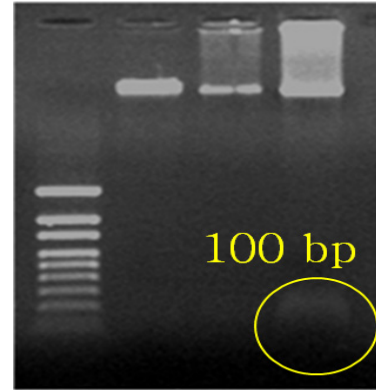
#### 3.2 λ-DNA 증폭

Continuous-flow PCR 칩의 온도 제어를 통하여 λ-DNA 증합효소 연쇄반응 실험을 진행 하였다. Continuous-flow PCR 칩의 증합효소 연쇄반응에 대한 확인을 위하여 현재 DNA 벡터로 많이 사용되는 λ-DNA를 이용하였다. Lambda λ는 대장균에 기생하는 DNA 바이러스로 증식과정에서 대장균의 일부 DNA를 전달시키는 효과도 있어 DNA의 전달을 위한 벡터로 유용하게 사용되어지고 있다. 이러한 λ-DNA 중 특정 부위 100 bp 만을 특이적으로 증폭 시키고자 하였다.

λ-DNA는 정확하고 빠르게 온도제어가 가능한 continuous-flow PCR 칩의 마이크로 채널을 따라 26 주기의 증합효소 연쇄반응이 진행 되었다. 〈그림 5〉에서 보는 것과 같이 continuous-flow PCR 칩의 정확하고 빠른 온도제어를 통하여 λ-DNA의 증합효소 연쇄반응을 성공하였다. 이는 전기영동 상의 100 bp의 밴드를 통하여 확인할 수 있다. 이를 통하여 continuous-flow PCR 칩의 온도가 정확하게 제어되었음을 확인할 수 있었다.

### 4. 결 론

본 논문에서는 반도체 공정을 이용하여 continuous-flow PCR 칩을 제작하고 ATMEGA128 마이크로 칩을 사용하여 continuous-flow PCR 칩의 온도를 제어하였다. 빠르고 정확한 온도제어를 통하여 λ-DNA의 증합효소 연쇄반응을 확인할 수 있었다. 따라서 기존의 PCR 장비가 가지고 있는 큰 온도 제어 시스템과 긴 작업시간 등의 단점을 ATMEGA128 마이크로 칩 제어를 통하여 해결하여 "Lab-on-a-chip" 또는 "Micro total analysis system (u-TAS)"에 응용될 수 있음을 확인 하였다.



〈그림 5〉 증합효소 연쇄 반응

#### [참 고 문 헌]

- [1] 정승룡, "연속흐름 증합효소 연쇄반응칩 제작을 위한 인듐 산화막 전극의 특성 분석", 대한전기학회 하계학술대회 논문집, 1386~1387, 2006
- [2] Chunsun Zhang, "PCR microfluidic devices for DNA amplification", Biotechnology Advance, 24, 243~248, 2006
- [3] 장유철, "Low DC power를 이용한 microfluidic cell lysis device", 대한전기학회 하계학술대회 논문집, 1563~1564, 2010
- [4] 조철호, "시료주입시 기포발생이 억제된 반응조 형태의 증합효소연쇄반응용 PDMS/유리 바이오칩", 대한기계학회논문집 A권, 제 30권, 1261~1268, 2006