

제한효소 반응용 PDMS/유리 마이크로 항온조 제작 및 특성평가

진석호* · 조용진* · 안유민†

(2004년 5월 11일 접수, 2004년 8월 3일 심사완료)

Study on PDMS/Glass Microthermostat Fabrication and Evaluation for Restriction Enzyme Reaction

Seok-Ho Jin, Yong-Jin Cho and Yoomin Ahn

Key Words : Microthermostat(마이크로 항온조), Restriction Enzyme Reaction(제한효소 반응), DNA(디옥시리보핵산)

Abstract

In this paper, we report a microthermostat using PDMS (poly-dimethylsiloxane) and glass. This PDMS/glass chip is able to maintain constant temperature that is necessary for restriction enzyme reaction. Since PDMS is the low-cost and the mass-producible material and has very good biochemical compatibility, PDMS chip has more benefit than general Si chip. Heater was made of Au wiring patterned on Pyrex glass. A reaction chamber has a capacity of about 3 μ l. We performed a restriction enzyme reaction by using the fabricated microthermostat and conventional method. Then, with the electrophoresis, we made a comparison between the result from the micro reactor and the one from conventional method.

1. 서론

최근 멤스(MEMS, microelectromechanical system) 기술의 발달로 여러 분야로의 응용이 활발히 진행되고 있다. 그 중 생화학 실험에의 적용 예가 랩 온어칩(lab-on-a-chip)이다. 일반 실험실에서 행하여지는 일련의 생화학적 반응 및 분석 등이 하나의 조그만 칩 상에서 이루어지는 것이 랩온어칩이다. 칩에 집적되어 있는 각종 마이크로 유체소자들과 센서 등에 의해 미량의 분석 대상 시료가 마이크로 유로(channel) 내에 흘러 보내지면서 원하는 실험 공정이 단시간에 수행되는 것이다. 이러한 랩 온어칩을 실현하기 위해서는 중요 칩 구성 요소들이 연구 우선 개발되어야 한다.^(1,2) 구성 요소 중 마이크로 반응기(microreactor)는 핵심 기본 요소라

할 수 있으며, 많은 연구가 진행되어 오고 있다.⁽³⁻⁷⁾ 특히 반응기 중에서 생화학적 반응 조건이 충족된 환경을 제공할 수 있는 마이크로 항온조에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.^(8,9)

바이오 랩온어칩용 마이크로 반응기에 대한 연구 대부분은 디옥시리보핵산(DNA) 중합효소 연쇄 반응(PCR, polymerase chain reaction)에 대한 것으로써, Zhan 등,⁽³⁾ Schabmueller 등,⁽⁴⁾ Schneega 등,⁽⁵⁾ 이 실리콘 재료를 이용한 마이크로 반응기를 제작하였다. 최근에는 실리콘보다 생화학적 친화성이 좋으며, 제작 방법이 간단한 중합체(polymer) 재료를 사용한 연구로서, Shin 등⁽⁶⁾은 PDMS(poly-dimethylsiloxane)로, Liu 등⁽⁷⁾은 PC(poly-carbonate)로 PCR 용 마이크로 반응기를 제작한 결과를 발표하였다. 그 이외의 연구로서는, 나노리터의 DNA 시료를 채취 분석(PCR, 전기영동, 검출) 할 수 있는 집적화 랩온어칩이 실리콘으로 Burns 등⁽⁸⁾에 의해 제작되었으며, 최근에는 단백질(protein) 용 마이크로 항온조가 PDMS로 Fuji⁽⁹⁾에 의해 만들어졌다.

마이크로칩 상에서 효소반응이 중요한 데 본 연구에서는 제한효소 반응을 적용하여 제작된 마이

* 한양대학교 대학원 정밀기계공학과

† 책임저자, 회원, 한양대학교 기계공학과,
마이크로바이오칩센터
E-mail : ahnym@hanyang.ac.kr
TEL : (031)400-5281 FAX : (031)406-5550

크로 항온조의 특성을 분석했다. 유전자 분석 및 재조합에 필수적인 제한효소 반응을 위한 마이크로 항온조를 PDMS 로 설계 제작하였다. 그리고 제작된 마이크로 항온조를 이용하여 실제 제한효소 반응 공정을 수행하였다. 수행 결과를 일반적으로 분자생물학 실험실에서 행해지는 방법으로 얻은 결과와 비교하여 마이크로 항온조의 효용성 여부를 판가름해 보았다

2. 마이크로 반응조의 설계 및 제작

본 연구에서는 칩의 주재료로 고분자 물질인 PDMS 와 유리(Pyrex glass) 기판을 이용하여 마이크로 항온조를 제작하였다. PDMS/유리 마이크로 항온조의 성능 비교를 위하여 유리와 실리콘으로 만든 마이크로 항온조도 함께 제작하였다. 마이크로 항온조의 개략도는 Fig. 1 과 같다. PDMS/유리 칩 경우에 시료가 들어갈 항온조는 PDMS 로 설계 하였으며, 시료의 빠른 가열을 위하여 항온조 밑면에 히터를 설계하였다. 항온조 밑의 유리기판에 전열선 역할을 하는 금(Au) 배선을 깔고 전류를 인가함으로써 히터를 가열하여 항온조 안의 시료가 가열되도록 하였다. 다른 연구자들에 의해 발표되었던 마이크로 반응기들에 주로 사용되어왔던 형태인 유리/실리콘 항온조 칩 경우에는 실리콘 실리콘 기판(wafer)을 수산화칼륨(potassium hydroxide, KOH)으로 식각하여 항온조를 형성하고 기판 뒤면에 히터 금속 배선을 만들었다. 주입구(inlet)와 배출구(outlet) 구멍은 드릴로 가공하였다. 가공된 유리 기판은 실리콘 항온조 위에 양극접합법(anodic bonding)으로 붙여 칩을 만들었다.

본 연구에서 제안된 PDMS/유리 마이크로 항온조는 Fig. 2 와 같은 공정 순서로 제작하였다. 먼저 유리기판 표면의 불순물을 제거하기 위해 120 ℃ 황산용액(H₂SO₄)에 약 10 분 동안 담가두어 세척한다. 히터 금속 배선을 구성하기 위하여 열증착법(thermal evaporation)으로 크롬을 200 Å, 금을 2000 Å 두께로 증착한다[Fig. 2(A)]. 사진공정(photolithography)과[Fig. 2(B, C)] 식각(etching)으로 [Fig. 2(D)] 히터 배선을 패터닝(patterning)한 후, 시료와 히터 배선 사이의 절연을 위하여 산화막을 5000 Å 증착한다[Fig. 2(E)].

다음에는 PDMS 가공용 복사형틀(replica mold)을 제작한다. 실리콘 기판 표면의 불순물 제거를 위해 120 ℃ 황산용액(H₂SO₄)에 약 10 분 간 세척한다. 세척된 기판 위에 감광제 SU-8 을 100 μm의 두께가 되도록 스펀코팅(spin coating) 한 뒤, 사진

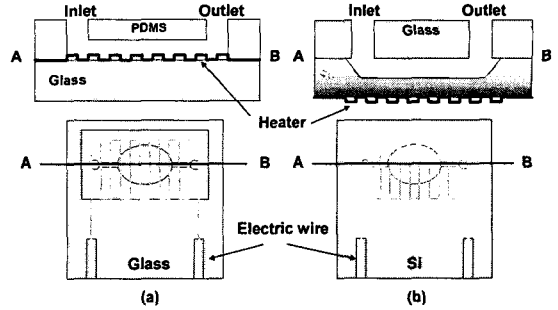


Fig. 1 Schematic of (a) PDMS/glass and (b) glass/Si microthermostat

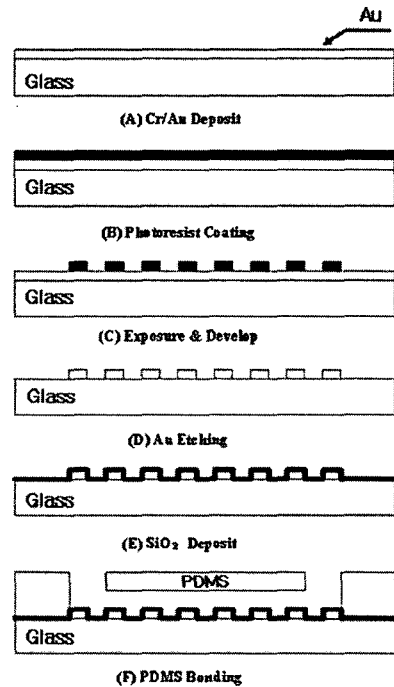


Fig. 2 Fabrication process of PDMS/Glass chip

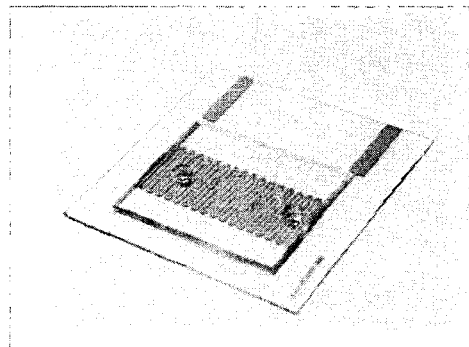


Fig. 3 Photographs of fabricated microthermostat for restriction enzyme reaction

공정을 통해 복사형틀을 제작한다. 제작된 형틀 위에 PDMS 를 도포하고 경화시킨 다음, 형틀에서 경화 된 PDMS 를 분리하여 복사물(replica)을 완성한다. 제작된 PDMS 복사물에 펀칭(punching)을 하여 주입구와 배출구를 만든다. 그리고 복사물 표면을 산소 플라즈마(O₂ Plasma) 처리하고 유리기판에 접착시켜 칩을 완성한다. 최종적으로 완성된 칩은 Fig. 3 과 같다.

3. 마이크로 항온조의 특성평가

제작된 마이크로 항온조의 특성을 확인하기 위한 실험을 먼저 하였다. 마이크로 항온조를 구동하기 위한 실험장치 구성은 다음과 같다. 먼저 히터 배선에 전원을 공급하기 위해 전원장치(power supply)로부터 (-)단자를 히터 배선 한쪽에 연결하고 (+)단자는 제어기를 통해 히터 배선 다른 한쪽에 연결하였다. 칩에 미세 구멍을 내고 항온조 내에 온도센서를 직접 꽂아 넣어 온도를 측정하였다.

제어기는 온도센서로부터 측정된 신호를 온도로 변환하여 측정온도를 설정된 온도에 비교하여 전원을 점멸제어(on/off control) 해주는 기능을 갖고 있다. 사용한 온도센서는 크로멜(+)과 알루멜(-)을 접합시켜 사용하는 K 형태의 열전대이다. 센서의 측정범위는 -200 °C ~ 1000 °C 이고, 오차범위는 0.5 °C 이하이다. 온도를 측정하는 팁(tip)의 직경은 500 μm로 항온조 칩에 직접 적용할 수 있도록 제작하였다.

마이크로 항온조 히터에 인가하는 적정 전압을 결정하기 위해, 항온조 칩 내에 탈이온수(D.I. water)을 넣고 인가전압을 2 V, 4 V, 6 V, 8 V, 10 V로 변화시키면서 실험을 수행하였다. 히터 전압을 10 분 동안 인가하면서 10 초 단위로 온도를 측정한 결과, 8 V 이상의 전압을 인가하였을 때만 원하는 항온조 온도인 37 °C 이상 도달할 수 있었다.

또한 히터를 30 분 동안 가열한 후 항온조 내의 시료의 상태를 살펴본 결과, 45 °C 이상으로 가열하였을 경우에는 항온조 내에 대량의 기포가 발생하였다. 그러나 40 °C 이하로 가열하였을 경우에는 소량의 기포도 발생되지 않았는데, 제한효소 반응에 별 문제가 없을 것으로 판단되었다. 이어지는 모든 실험에서, 시료의 가열 및 항온 온도는 37 °C로 그리고 인가 전압은 8 V로 하였다

PDMS/유리 항온조로서의 성능을 평가하기 위해서 가열 및 냉각실험을 실시하였다. 또한 성능 비교를 위해 함께 제작한 유리/실리콘 항온조도 동일 조건으로 가열 및 냉각 실험을 진행하고 각각

의 결과를 비교하였다. 히터를 가열했을 때의 시간에 따른 항온조의 온도변화는 Fig. 4 와 같고, 히터를 냉각했을 때의 시간에 따른 항온조의 온도변화는 Fig. 5 와 같다.

먼저 가열에 따른 온도변화를 살펴보면 PDMS/유리 칩의 가열특성이 유리/실리콘 칩보다 약간 우수한 것으로 나타났다. 이는 PDMS/유리 칩 설계 시 PDMS 가 실리콘보다 열전도도가 낮은 것을 고려하여 항온조 내에 히터를 설치하여 시료를 직접 가열할 수 있도록 했기 때문이라고 생각된다. 또한 열전도도가 낮은 PDMS 칩에서 열의 방출이 상대적으로 적은 때문이라고 생각된다. 냉각에 따른 온도변화를 살펴보면 PDMS 의 낮은 열전도도 때문에 PDMS/유리 칩이 냉각 속도가 느린 것으로 나타났다. 이것은 가열과 냉각이 빠른 시간 내에

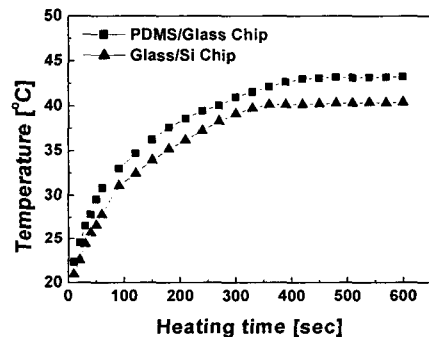


Fig. 4 Temperature of microthermostat as function of heating time

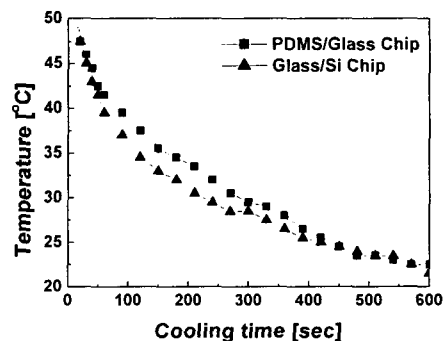


Fig. 5 Temperature of microthermostat as function of cooling time

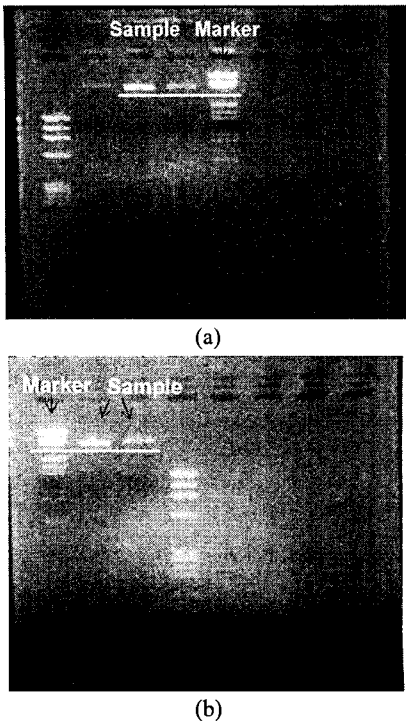


Fig. 6 Photographs of slab gel electrophoresis of restriction enzyme reaction of (a) 37 °C, 90 min by microthermostat and (b) 37 °C, 3 hours by conventional method

반복되어야 하는 증합효소연쇄반응(PCR)의 경우에는 단점으로 여겨지지만 항온 유지가 중요한 제한효소반응의 경우에는 장점으로 판단되며, 유리/실리콘 칩보다 적은 전력이 소비되리라 생각된다.

4. 제한효소 반응 실험

제한효소는 DNA의 특정부위를 자름으로써, 산업 및 의료용으로 폭넓게 사용되고 있다. 일반적으로 제한효소 반응은 3 단계로 나누어져 있다. 먼저, DNA와 제한효소 그리고 완충액(buffer)을 섞은 다음 37 °C 항온조에 약 2 시간 넣는다. 그 다음, 잘린 DNA를 분리하기 위해 전기영동(gel electrophoresis)을 약 1 시간에 걸쳐 한다. 끝으로, 전기영동 후 사진 촬영하여 DNA 분리 유무를 확인한다. 제작된 마이크로 항온조의 성능을 확인하기 위해 일반적인 분자생물학 실험실에서 수행하는 방법과 병행하여 제한효소 반응실험을 하였다. 본 실험에서는 플라스미드(plasmid) pQE-30라는 유전자를 이용하였다. 플라스미드란 염색체와는 별

개로 세균의 세포 내에 존재하면서 독자적으로 증식할 수 있는 DNA의 고리 모양인 유전자이다. 플라스미드의 총 크기는 3461 bp이며 일반적으로 DNA 재조합 공정 시 MCS(Multi Cloning Site) 부분의 염기서열을 절단하고 합성하여 공정을 진행한다. MCS 부분은 매우 복잡한 염기서열로 되어 있는데, 이 부분의 특정위치를 절단할 수 있는 제한효소 중 BamHI과 HindIII를 실험에 사용하였다. BamHI은 염기서열 GGATC를 인식하고 찾아 절단하고, HindIII는 염기서열 AGCT를 찾아 절단한다.

실험방법은 먼저 탈이온수(D.I. water) 5 µl에 DNA 샘플인 플라스미드 pQE-30을 3 µl 넣고, 10 배 희석한 완충액을 1 µl 넣고 제한효소를 0.2~0.5 µl 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 마이크로 피펫(micro pipette)으로 PDMS/유리 칩에 주입한 뒤, 37 °C로 가열하여 90 분간 유지시켰다. 반응이 끝난 후 시료를 채취하고 전기영동으로 결과를 확인하였다. 그리고 똑 같은 시료를 일반적 실험실 방법으로도 37 °C로 3 시간 가열하여 제한효소 반응을 시켰다.

제한효소 반응을 마친 시료들을 두 개의 젤 라인(gel line)에 각각 주입시켜 전기 영동을 하였다. 분리된 DNA를 자외선을 이용하여 확인하고 자외선 사진기로 찍어 분석하였다. Fig. 6(a)는 본 연구에서 제안된 마이크로 항온조를 이용한 실험 결과의 전기영동 사진이며 Fig. 6(b)는 일반적 실험실 방법으로 행한 실험결과이다. 두 사진 모두 인덱스 띠(index band, marker)와 동일한 두 개의 플라스미드 샘플 띠(band)를 볼 수 있다. Fig. 6에서 알 수 있듯이 마이크로화 된 칩을 이용한 제한 효소 반응이 일반적인 실험실 방법과 다른 결과를 보이고 있으며, 보다 짧은 시간 내에 미량의 시료로도 똑같은 결과가 도출되는 것을 알 수 있다. 일반적으로 효소반응에 2 시간 가열이 필요한 데 반해 마이크로 항온조에서는 90 분이면 되는 이유는, 마이크로 항온조 안의 시료가 매우 적어서 효소반응에 필요한 총 열량도 적으므로 가열시간이 적게 필요하기 때문이라 생각된다.

5. 결론

유전자 분석에 중요하게 사용되는 제한효소 반응을 위한 마이크로 항온조를 개발하였다. 마이크로 칩에 일반적으로 사용되는 실리콘 대신에 값싸고 제작이 비교적 간단하며 생화학적으로도 안정한 PDMS를 이용하여 마이크로 항온조를 제작하

였다. 본 연구에서 제작된 마이크로 항온조를 사용하는 방법과 일반적인 생화학실험실에서 행하는 방법 대로 제한효소 반응을 수행하여 보았다. 실험결과 비교에 의하면, 마이크로 항온조를 이용한 제한 효소 반응이 일반적인 실험실 방법과 다른 것은 결과를 내고 있으며 무엇보다 빠른 시간 내에 미량의 시료로도 똑같은 결과를 도출해 낼 수 있었다.

DNA 분리확인에 주로 사용되는 전기영동장치를 마이크로화 하여 본 마이크로 항온조 칩에 통합시키는 연구를 진행 중에 있다. 제한효소 반응을 전기영동에 의한 DNA 분리 유무확인 작업까지 하나의 칩 상에서 수행할 수 있다면, 바이오칩으로서의 장점을 많이 갖게 되며 궁극적인 목표인 랩온어칩에 보다 다가설 수 있으리라 생각된다.

후 기

제한효소 반응 실험을 도와주신 한양대학교 생화학 및 분자생물학과 황승용 교수 유전체 연구실 관계자 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

- (1) Suh, Y. K. and Heo H. S., 2003, "A Numerical Study on Stirring Characteristics in a Microchannel with Various Arrangement of Blocks," *Trans. of the KSME (B)*, Vol. 27, No. 7, pp. 901~908.
- (2) Kim, H.-Y. and Lee, Y. P., 2003, "Deflection of a Thin Solid Structure by a Thermal Bubble," *Trans. of the KSME (B)*, Vol. 27, No. 2, pp. 236~242.
- (3) Zhan, Z., Dafu, C., Zhongyao, Y. and Li, W., 2000, "Biochip for PCR Amplification in Silicon," *1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, Lyon, France, pp. 25~28.
- (4) Schabmueller, C. G. J., Evans, A. G. R., Brunnschweiler, A., Ensell, G., Leslie, D. L. and Lee, M. A., 2000, "Design, Fabrication and Packaging of Closed Chamber PCR-Chips for DNA Amplification," *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*, Vol. 4019, pp. 362~369.
- (5) Schneega, I., Bräutigam, R., and Köhler, J. M., 2001, "Miniaturized Flow-Through PCR with Different Template Types in a Silicon Chip Thermocycler," *Lab on a Chip*, Vol. 1, pp. 42~49.
- (6) Shin, Y. S., Cho, K., Lim, S. H., Chung, S., Park, S.-J., Chung, C., Han, D. C. and Chang, J. K., 2003, "PDMS-Based Micro PCR Chip with Parylene Coating," *J. Micromech. Microeng.* Vol. 13, pp. 768~774.
- (7) Liu, R. H., Yang, J., Lenigk, R., Bonanno, J. and Grodzinski, P., 2004, "Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection," *Anal. Chem.*, Vol. 76, pp. 1824~1831.
- (8) Burns, M. A., Johnson, B. N., Brahmasandra, S. N., Handique, K., Webster, J. R., Krishnan, M., Sammarco, T. S., Man, P. M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, and Burke, D. T., 1998, "An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device," *Science*, Vol. 282, pp. 484~487.
- (9) Fujii, T., 2002, "PDMS-Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications," *Microelectron. Eng.*, Vol. 61-62, pp. 907~914.