

# DNA 측정용 SH-SAW 센서 개발

## Development of an SH-SAW Sensor for Detection of DNA

허영준\*, 박유근\*\*, 노용래\*

(Youngjune Hur\*, Yukeun Eugene Pak\*\*, Yongrae Roh\*)

\*경북대학교 기계공학부, \*\*삼성종합기술원 MEMS Lab

(접수일자: 2004년 9월 30일; 채택일자: 2005년 2월 3일)

본 연구에서는 DNA의 고정화 및 DNA 혼성화 반응을 감지할 수 있는 SH형 SAW 센서를 개발하였다. 고정화 및 혼성화 반응에 사용된 탐침 DNA 및 표적 DNA는 상보적 결합이 일어날 수 있는 염기서열을 가진 15-mer의 올리고뉴클레오티드를 사용하였다. SH형 SAW 센서는 압전 단결정 36° YX LiTaO<sub>3</sub>를 사용하여 100 MHz로 발진되는 이중 지연선 형태로 제작하였다. 제작된 센서는 Au가 증착된 박막위에 고정화된 탐침 DNA와 표적 DNA와의 혼성화 반응을 시키고 난 후 센서의 주파수 변화를 측정하였으며, DNA 고정화 및 혼성화 반응은 pH 7.4의 PBS 완충용액상에서 수행하였다. 개발된 SH형 SAW센서는 1.55 ng/ml/Hz의 민감도를 가지며, DNA 혼성화 특성에 기인한 질량하중 효과에 따른 안정적인 주파수 변화를 나타내었다.

**핵심용어:** SH-SAW, 오실레이터, 올리고뉴클레오티드, DNA 고정화, DNA 혼성화

**투고분야:** 초음파 및 탄성파 분야 (4.6)

We have developed SH (shear horizontal) surface acoustic wave (SAW) sensors for detection of the immobilization and hybridization of DNA (deoxyribonucleic acid) on the gold coated delay line of transverse SAW devices. The experiments of DNA immobilization and hybridization were performed with 15-mer oligonucleotides (probe and complementary target DNA). The sensor consists of twin SAW delay line oscillators operating at 100 MHz fabricated on 36° rotated Y-cut LiTaO<sub>3</sub> piezoelectric single crystals. The relative change in the frequency of the two oscillators was monitored to detect the hybridization between target DNA and immobilized probe DNA in pH 7.4 PBS (phosphate buffered saline) solution. The measurement results showed a good response of the sensor to the mass loading effects of the DNA immobilization and hybridization with the sensitivity up to 1.55 ng/ml/Hz.

**Keywords:** SH-SAW, oscillator, oligonucleotide, DNA immobilization, DNA hybridization

**ASK subject classification:** Ultrasonic and Elastic Waves (4.6)

## I. 서론

최근 생명공학의 혁명적인 발달과 더불어 가장 관심을 끄는 기술 중의 하나가 DNA (Deoxyribonucleic Acid) 센서 기술이다. 이러한 DNA 센서는 고체기질 위에 붙여 놓은 탐침 DNA (Probe DNA)와 검색하고자 하는 표적 DNA (Target DNA) 사이에서 상보적인 혼성화 반응이 일어나는 것을 이용하여 표적 DNA 내에 특정 DNA의 염기서열 분석을 통해 유전적인 질병은 물론 전염병 등을

진단하고자 하는 노력들이 시도되고 있다[1,2]. DNA의 염기서열을 분석하는 방법으로는 질량분석, 광을 이용한 분석, 전기화학적 분석법이 일반적으로 사용되고 있다 [3-5]. 이러한 방법 등은 고가의 대형 장비를 이용해야 하거나, 분석 단계가 복잡하고 훈련된 기술자가 필요하다는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근에는 높은 민감도를 가지는 초소형 센서의 개발이 요구되고 있다[6]. 이러한 관점에서 특히, 음향파를 이용한 DNA 센서에 대한 관심이 증대되고 있다. 음향파를 이용한 DNA 센서로는 두께 진동 모드를 이용한 QCM (Quartz Crystal Microbalance)과 표면탄성파를 적용한 SAW (Surface Acoustic Wave) 센서가 대표적이다. 일

책임저자: 노용래 (yryong@knu.ac.kr)  
대구광역시 북구 산격동 1370 경북대학교 기계공학부  
(전화: 053-950-6828; 팩스: 053-956-9914)

반적으로 QCM 센서는 간편하고 사용하기 쉽기 때문에 가장 보편적인 압전 기기로 사용되고 있고, DNA 센서로 일찍이 사용되어 왔다[7]. 하지만, QCM 시스템의 주요한 단점은 저분자량의 생체물질 측정시 감도 신뢰성이 떨어진다는 점이다[8]. 따라서, 본 연구에서는 QCM의 낮은 감도 특성을 해결하고, 우수한 선형성, 연속 측정성, 디지털출력에 따른 전자시스템과의 접합 용이성, 반도체 공정기술을 이용하여 센서의 집적화와 소형화 등을 이룰 수 있는 DNA 측정용 SAW 센서를 개발하고, 제작된 센서를 사용하여 DNA의 선택적인 상보적 결합 반응을 측정하고자 하였다. DNA 센서의 측정대상은 통상 다량의 수분을 함유하고 있는 생체 용액이기 때문에 측정 환경이 액상이며, DNA의 혼성화 반응을 감지하기 위해서는 높은 감도 및 신호 안정성을 요구한다. 보편적으로 널리 사용되는 Rayleigh 파로 구현한 SAW 센서는 수중으로의 에너지 손실이 크게 발생하기 때문에 DNA 센서 용으로는 적합하지 않다. 반면 표면에서 전단 방향의 변위를 가지며 전파하는 SH(Shear Horizontal)-SAW를 이용하면 액상으로의 SAW 에너지 감쇠가 적고, 신호 대 잡음비와 시스템 안정성에서 우수한 특성을 가진다[9]. 또한 센서의 질량 민감도는 작동 주파수의 제곱에 비례하므로, SAW를 사용할 경우 작동 주파수가 통상의 QCM 센서에 비해 높기 때문에 DNA의 상보적 혼성화 반응을 정확히 탐지하는데 유리하다.

본 연구에서는 이러한 배경에 의해  $36^\circ$  YX LiTaO<sub>3</sub> 압전 단결정을 사용하여 작동 주파수 100 MHz로 발진되는 SH-SAW 센서를 개발하였다. 제작된 SAW소자의 지연선 위에 측정 대상인 표적 DNA에 대해서 선택적으로 결합이 가능한 탐침 DNA를 고정화시켰다. 실험에서 사용된 DNA는 합성 올리고뉴클레오티드 (Oligonucleotide)를 사용하였으며 DNA끼리의 혼성화 반응을 감지하기 위해 표적 DNA는 탐침 DNA와 완전히 상보적(Complementary) 결합이 가능한 것을 사용하였다. 따라서 탐침 및 표적 DNA가 상보적인 경우에만 DNA 혼성화 반응이 일어남에 따른 센서 지연선 상의 질량의 증가에 의한 센서의 주파수 변화를 측정하였다. 이러한 SAW 센서의 주파수 변화는 DNA의 혼성화 반응의 정도를 나타낸다. 최근 DNA, 단백질 셀과 같은 생물학적 물질의 특정 반응을 측정할 수 있는 마이크로, 나노 단위의 센서의 개발이 크게 요구되고 있는데, 본 연구에서는 이러한 요구에 부응하여 음향파를 이용한 초소형 DNA 센서를 제작하였으며, 이는 유전자공학, 분자생물학, 생명공학 등의

DNA 연구분야에 응용될 수 있을 것이다.

## II. 제작

본 센서의 기판으로는 LiTaO<sub>3</sub> 결정의  $36^\circ$  Y축 절단면과 X축 전파 방향을 이용하여 횡단 방향의 변위 분극을 가지는 SH-SAW를 발진시키도록 하였다. 제작된 소자는 그림 1과 같이 두 개의 개별 SAW 소자가 병렬로 결합된 형태를 가지며, 각각의 SAW 소자는 압전 단결정 기판 위에 설치되는 입력출력용 IDT로 구성된다. 이중 지연선 형태를 취하여 SAW를 둘러싼 모든 환경에 노출된 디바이스를 기준 채널(Reference Channel)이라고 하고, 지연선 상에 특정 감지막을 증착시켜서 SAW가 주위 환경과 더불어 특정 측정변수에 더 많이 반응을 할 수 있도록 한 디바이스를 측정 채널(Sensing Channel)이라고 한다.

그림 1에서 보듯이 측정 채널에 DNA를 잘 고정시킬 수 있는 박막을 증착한 다음, 측정 채널과 기준 채널의 신호 차이를 구하면 그 결과는 DNA에만 반응한 신호가 될 것이다. 센서의 각 지연선은 오실레이터로 구현된다. 센서의 입력 IDT는 SAW 에너지가 지연선 방향으로 집중되도록 SPUDT (single phase uni-directional transducer)형태로 설계하였다[10]. 또한 LiTaO<sub>3</sub> 압전 기판의 가장자리에서 원하지 않는 SAW의 반사를 감쇠시키기 위하여, 폴리머 계열의 에폭시 층을 기판의 뒷면과 바닥에 도포하였다. 또한 SAW 소자가 수중환경에서 작동할 수 있도록 IDT와 신호 연결부의 절연처리를 IDT와

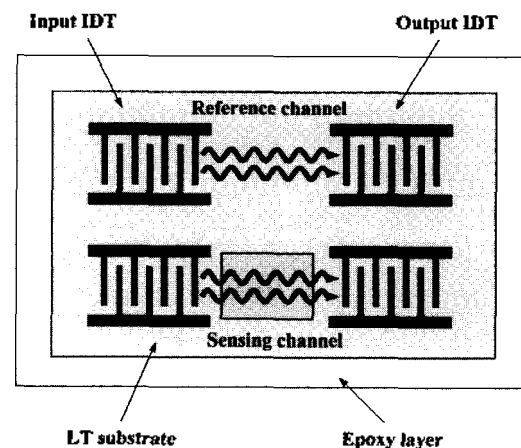


그림 1. 이중 채널의 SAW 소자 구조

Fig. 1. Structure of dual channel SAW device.

신호 연결부 전체를 상온 경화형 실리콘 고무로 도포하였다. 제작된 SAW 센서의 사진을 그림 2에 나타내었다.

### III. 실험 및 측정

#### 3.1. 시료

본 연구에 사용된 모든 DNA는 (주)제노텍에서  $1 \mu\text{mol}$  스케일로 위탁합성한 것을 구입하였으며 HPLC (High performance liquid chromatography)로 정제한 후 동결건조된 것을 사용하였다. 실험에 사용된 탐침 DNA 올리고뉴클레오티드는 5'-Thiol(O6)-GTT CTT CTC ATC ATC-3'의 염기서열을 가지며 표적 DNA는 이에 대해 상보적인 5'-GAT GAT GAG AAG AAC-3' 염기서열을 가지는 것을 사용하였다. 이상의 DNA는 모두 pH 7.4의 PBS (Phosphated buffered saline) 완충용액에 녹여서 사용하였다. 실험에 사용된 모든 용매들은 Aldrich Chemical사의 HPLC 급을 사용하였으며 실험은 모두 상온에서 수행하였다.

#### 3.2. Probe DNA Immobilization

SAW 센서를 DNA 센서로 활용하기 위해서, 우선 센서의 측정 채널 지연선 표면에 Ti를 증착한 후 그 위에 다시 Au막을 열증착기를 이용하여 증착하였다. 여기서 Ti는 Au막과 압전 기판 사이의 접착성을 향상시키기 위하여 완충층으로 사용하였다. 싸이올 (thiol)이 수식된 탐침 DNA는 자가조립 단분자 (Self-Assembled Monolayer, SAM) 형성법을 사용하여 Au 박막위에 다음과 같은 과

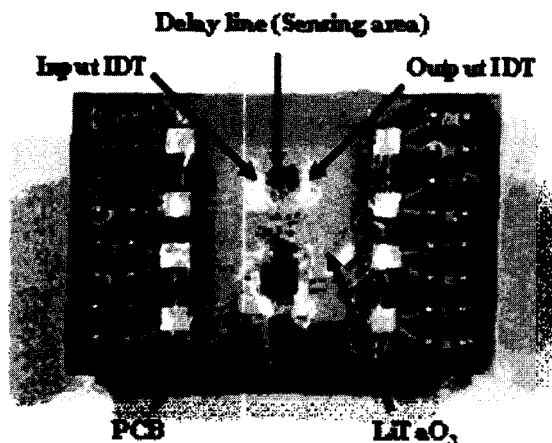


그림 2. 제작된 SAW 센서

Fig. 2. The photograph of a fabricated SAW device.

정으로 고정화시켰다.

먼저, 지연선 위의 Au 표면을 Piranha 용액 (황산: 과산화수소 = 3 : 1), 아세톤, 메탄올, 탈이온수의 순서로 깨끗하게 세척하였다. 그 다음, 말단에 싸이올이 수식된 탐침 DNA (5'-GTT CTT CTC ATC ATC-3')를 PBS 완충용액으로  $1 \mu\text{M}$ 이 되도록 용해한 다음 이를 마이크로 피펫을 이용하여 세척된 Au 표면에 떨어뜨려 반응시켰다. 이상으로 측정 채널 표면위에 탐침 DNA의 고정화를 수행하였다.

#### 3.3. Target DNA Hybridization

탐침 DNA가 고정화된 Au 표면 위에 측정대상인 표적 DNA를 주입하여 혼성화 반응을 시키기전에 먼저 센서 표면에서 일어날 수 있는 비특이적 결합을 방지하기 위해 spacer로 6-mercapto-1-hexanol (MCH)를 반응시켰다. 다음으로 PBS 완충용액에  $1 \mu\text{M}$  농도의 표적 DNA 용액을 주입하여 3시간 동안 처리하여 혼성화 반응을 완

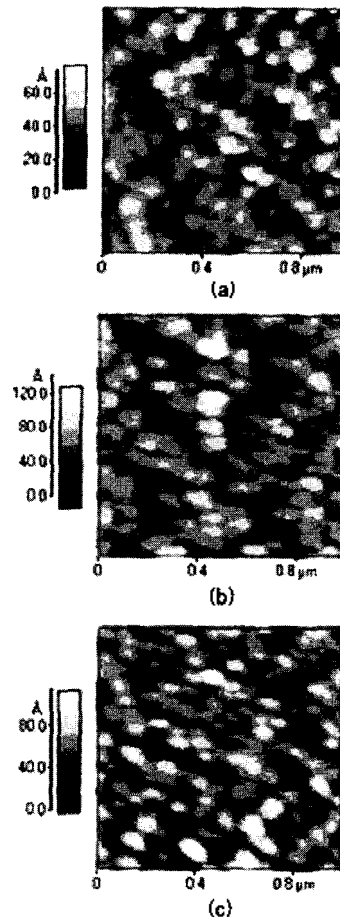


그림 3. 반응단계별 AFM 사진: (a) Bare Au, (b) DNA 고정화, (c) DNA 혼성화

Fig. 3. AFM images of (a) bare Au, (b) immobilized probe DNA on the Au surface, and (c) hybridized probe and target DNA on the Au surface.

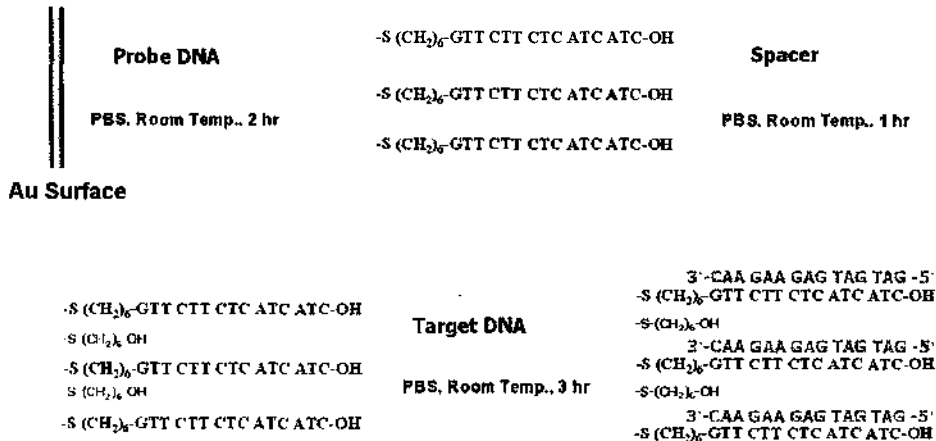


그림 4. DNA 감지막 형성의 반응단계별 도식적 구조  
Fig. 4. The process to fabricate the DNA sensing layer.

표시했다. 이상의 과정에서 DNA가 센서 지연선 Au 표면 위에 형성되는 것을 확인하기 위하여 표면분석장치인 AFM (atomic force microscopy)을 사용하였으며 이를 그림 3에 나타내었다. 반응단계별로 AFM을 사용하여 표면상태를 측정된 결과 (a) Au만 증착된 경우의 표면거칠기는 10.3 Å, (b) Au가 증착된 표면 위에 probe DNA가 고정된 후는 18.0 Å, (c) target DNA와 고정화된 probe DNA와의 혼성화 반응이 일어난 후는 17.1 Å로 각각 나타났다. 이로부터 반응의 진행에 따라 표면에서의 거칠기 값이 변화하였으며 이는 각각 반응단계별로 표면에서의 형태가 변했다는 것을 의미하며 앞서 기술한 방법에 의해 DNA 박막 형성되었음을 유추할 수 있었다 [11]. 이상의 공정을 거쳐 SAW 센서의 지연선 위에 DNA 박막이 형성되는 구조를 그림 4에 도식적으로 나타내었다.

### 3.4. 측정

본 연구에서는 네트워크 분석기 (Network Analyzer, HP 8752C)를 사용하여 SAW 센서의 DNA 고정화 및 혼성화 반응의 동작 상태를 확인하고 감지신호를 획득하였다. 탐침 DNA와 표적 DNA를 반응시키기 전의 SAW 소자의 전달 특성과 탐침 DNA를 고정화시킨 후의 소자의 전달 특성 및 탐침 DNA와 표적 DNA와의 혼성화 반응이 완전히 끝난 소자의 전달 특성을 측정하여 비교하여 보았다. 그림 5에서 보듯이 각 단계별 반응에 따라 SAW 센서의 주파수 스펙트럼의 삽입손실이 미약하게 증가하였지만 전체 스펙트럼은 초기 상태를 유지함을 알 수 있다. 네트워크 분석기를 사용하여 측정된 결과, 삽입 손실 및 중심주파수 이동이 발생함으로써 지연선 위에 탐

침 DNA가 고정화 되었으며, 또한 고정화된 탐침 DNA가 표적 DNA와 결합하였음을 보여주었다. 이상에서 살펴 보았듯이 각 반응 단계별로 확인한 주파수 변화를 보임으로써, 제작된 SAW 센서를 DNA 센서로 이용 가능함을 확인할 수 있었다. Probe DNA의 immobilization과 spacer의 고정화 과정 그리고 target DNA의 hybridization을 과정을 위의 SAW 센서 시스템을 이용하여 실시간으로 연속적으로 측정하였다. 그림 6에 각

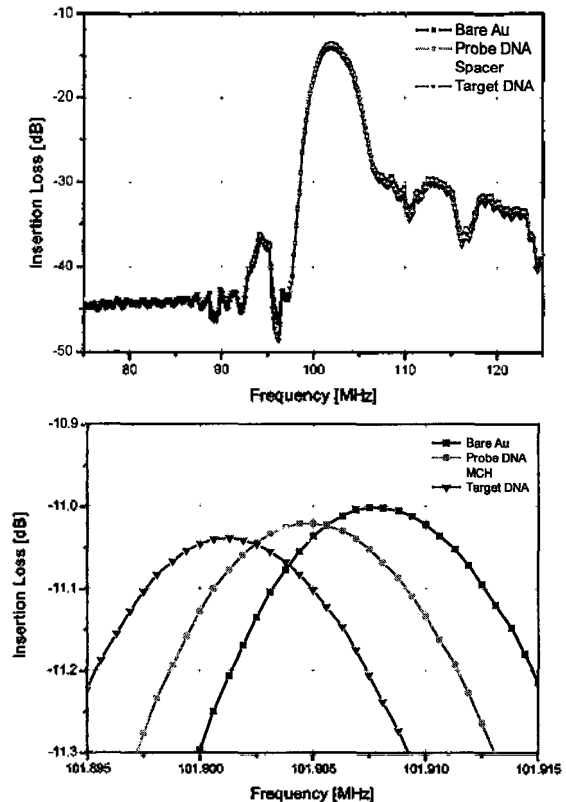


그림 5. 반응단계별 주파수 스펙트럼  
Fig. 5. Frequency spectrum vs. reaction step.

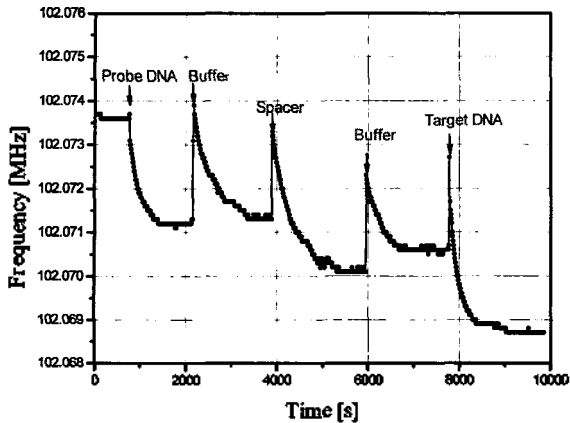


그림 6. 반응단계별 실시간 주파수 변화  
Fig. 6. Frequency shifts with time of the each step.

반응단계별 주파수 변화를 SAW 센서 시스템으로 측정 한 결과를 나타내었다. 반응이 진행됨에 따라 센서 감지 막에서 일어나는 질량하중 효과에 기인한 주파수 변화를 알 수 있었으며, 또한 각 단계별 반응의 시간 의존성을 파악 할 수 있었다. 제작된 SAW 센서 시스템의 성능평가를 위하여 target DNA의 농도를 변화시켜 표 1과 같이 A, B, C, D의 순서로 추가시켰다. 그림 7에 target DNA의 농도에 대해서 측정 채널의 실시간 오실레이션 주파수 변화를 나타내었다. 고정화된 probe DNA가 주입되는 target DNA와 hybridization 함에 따라 센서 지연선 위에 질량은 증가하게 되며, 그 결과 SAW의 속도는 감소하여 오실레이션 주파수의 감소를 나타내었다. 그림 7에서 나타났듯이 그래프 상의 A점에 농도 0.04674  $\mu\text{g/ml}$ 의 target DNA 20  $\mu\text{l}$ 를 추가시켰을 때 1,500 초 후에 약 -300 Hz의 주파수 변화를 보여주며, B, C, D 과정을 거치면서 6,000 초 후에 총 -2.5 kHz의 변화를 보였다. 이상의 결과에서 target DNA의 농도

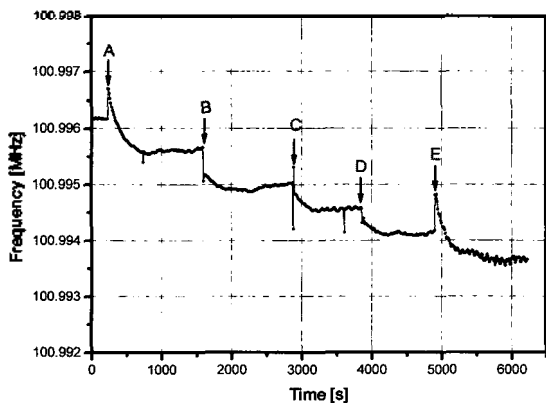


그림 7. 표적 DNA 농도에 따른 주파수 실시간 변화  
Fig. 7. Frequency changes with time vs. target DNA concentration.

표 1. 각 측정단계별 target DNA 농도

Table 1. The target DNA concentration at each step of the experiment.

Step	Target DNA concentration
A	0.4674 $\mu\text{g/ml}$
B	2.337 $\mu\text{g/ml}$
C	4.674 $\mu\text{g/ml}$
D	9.348 $\mu\text{g/ml}$
E	18.696 $\mu\text{g/ml}$

가 증가할수록 오실레이션 주파수가 감소함을 알 수 있다. 이상의 실험을 반복하여 얻은 결과들을 종합하여 그림 8에 나타내었으며, target DNA의 농도에 따른 오실레이션 주파수 변화가 일정한 경향성을 가짐을 보여준다. 그림에서 target DNA의 농도가 높을수록 주파수 변화가 커짐을 알 수 있다. 이는 저농도에서 보다 고농도에서 DNA의 상보적 결합이 더 많이 일어나며 또한 이로 인한 질량하중 효과가 크기 때문이라 판단된다. 이상의 결과로부터 센서는 평균 감도 1.55  $\text{ng/ml/Hz}$ 를 가지며 target DNA의 질량 하중 효과에 대한 안정된 주파수 변화를 보였다. 이상의 실험 결과로부터 DNA의 상보적인 결합에 대한 측정 가능한 주파수 변화를 보임으로써, SAW 오실레이터 센서가 DNA 센서로 사용 가능함을 확인할 수 있었다.

#### IV. 결론

본 연구에서는 DNA의 상보적인 결합에 의한 DNA 혼성화 특성을 감지 할 수 있는 SH-SAW 센서를 개발하였

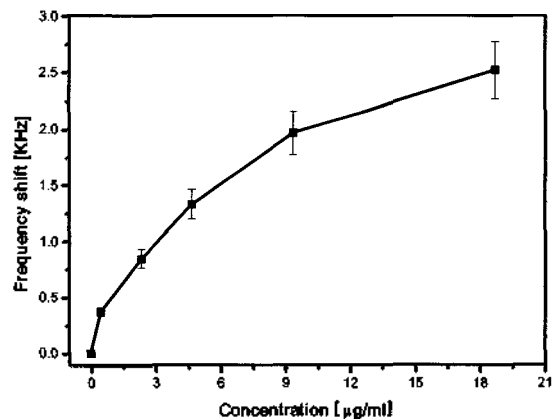


그림 8. 표적 DNA 농도에 따른 센서의 주파수 변화  
Fig. 8. Frequency shift of the sensor vs. target DNA concentration.

다. 36°YX LiTaO<sub>3</sub> 압전 기판을 사용하여 SAW 소자를 제작하고, SAW 센서 시스템을 구성함으로써, 탐침 DNA가 고정화된 지연선 위의 표적 DNA가 선택적으로 결합함에 의한 질량 하중 효과를 주파수 변화로 측정할 수 있었다. 제작된 센서는 공진주파수와 target DNA 농도 간의 안정된 관계를 보였으며, 1.55 ng/ml/Hz의 평균 감도 특성을 나타내었다. 개발된 DNA 측정용 SAW 센서는 장치 및 설비가 간단하고, 저가에 구현 가능하며, 별도의 표지가 필요하지 않으며, 실시간으로 측정 가능한 물론 반도체 기술과 접목이 가능하여 센서의 출력이나 측정 방법 등을 집적화한 초소형 센서로 구현할 수 있는 장점을 가진다. 최근 DNA, 단백질 등의 생물학적 물질의 특정 반응을 측정할 수 있는 소형의 바이오 센서의 개발이 크게 요구되고 있는 실정에서 본 연구에서 개발된 SAW 센서는 이러한 요구에 부합하며 감지층으로 다양한 염기서열의 DNA를 사용하여 생명공학 연구의 중요한 부분인 유전자 연구에 기여할 수 있을 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 산업자원부 차세대신기술개발사업 (00013107)의 지원으로 수행되었음.

### 참고 문헌

1. Benjamin Lewin, "GENES VI", Oxford University Press and Cell Press, 1994, 89-90.
2. K. Skogerboe, "Molecular Biology Techniques", Anal. Chem., 65, 416-419, 1993.
3. Y. Cui, Q. Wei, H. Park, and C. M. Lieber, "Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species", Science, 293, 1289-1291, 2001.
4. G. Marra and P. Schar, "Recognition of DNA alteration by the mismatch repair system", Biochemical Journal, 338, 1-13, 1999.
5. T. Nordstorm, M. Ronaghi, L. Forsberg, U. DeFaire, R. Morgenstern, and P. Nyren, "Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing", Biotechnol. Appl. Biochem., 31, 107-112, 2000.
6. I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, A. L. Ghindilis and E. Wilkins, "Development of a flow-through immunoassay system", Sensors and Actuators B, 49, 202-210, 1998.
7. Keiko Ito, Koji Hashimoto, Yoshio Ishimori, "Quantitative analysis for solid-phase hybridization reaction and binding

reaction of DNA binder to hybrids using a quartz crystal microbalance", Anal. Chim. Acta, 327, 29-35, 1996.

8. P. B. Lippa, L. J. Sokoll and D. W. Chan, "Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry", Clinica Chimica Acta, 314, 1-26, 2001.
9. W. Welsch, C. Klein, M. V. Schickfus and S. Hunklinger, "Development of a surface acoustic wave immunosensor", Anal. Chem., 68, 2000-2004, 1996.
10. 이승희, 노용래, "DART와 EWC/SPUDT형 SAW 필터의 특성 비교", 한국음향학회지, 18, 53-59, 1999.
11. R. Moller, A. Csaki, J. M. Kohler and W. Fritzsche, "DNA probes on chip surfaces studied by scanning force microscopy using specific binding of colloidal gold", Nucleic Acids Res., 28, E91-95, 2000.

### 저자 약력

#### • 허 영 준 (Youngjune Hur)



1994년 2월: 경북대학교 고분자공학과 졸업(학사)  
1996년 2월: 경북대학교 고분자공학과 졸업(석사)  
2002년 2월: 경북대학교 센서공학과 (박사)  
2002년~2004: 삼성종합기술원, 연구원  
2004년~현재: 경북대학교 기계공학부, Post-Doc.  
연구원

#### • 박 유 근 (Yukeun Eugene Pak)

1980년: State University of New York at Buffalo, Mechanical Eng. (학사)  
1982년: Stanford University, Mechanical Eng. (석사)  
1985년: Stanford University, Mechanical Eng. (박사)  
1994년: State University of New York at Stony, academic position  
1995년~현재: 삼성종합기술원, Sensors Program Director of MEMS Lab.

#### • 노 용 래 (Yongrae Roh)

한국음향학회지 제 20권 제 4호 참조