

〈 논문 〉

시료주입시 기포발생이 억제된 반응조 형태의 중합효소연쇄반응용 PDMS/유리 바이오칩

조철호* · 조 웅** · 안유민† · 황승용***

(2006년 4월 17일 접수, 2006년 7월 20일 심사완료)

PDMS/Glass Serpentine Microchannel Chip for PCR with Bubble Suppression in Sample Injection

Chul-Ho Cho, Woong Cho, Yoomin Ahn and Seung-Yong Hwang

Key Words : Polymerase Chain Reaction(중합효소연쇄반응), Serpentine Microchannel Reactor(사선 마이크로채널 반응조), PDMS/Glass DNA Chip (PDMS/유리 유전자칩)

Abstract

This paper reports low-cost microreactor (10 μl) biochip for the DNA PCR (polymerase chain reaction). The microbiochip (20mm \times 28mm) is a hybrid type which is composed of PDMS (polydimethylsiloxane) layer with serpentine microchannel (360 μm \times 100 μm) chamber and glass substrate integrated with microheater and thermal microsensor. Undesirable bubble is usually created during sample loading to PDMS-based microchip because of hydrophobic chip surface. Created bubbles interrupt stable biochemical reaction. We designed improved microreactor chamber using microfluidic simulation. The designed reactor has a corner-rounded serpentine channel architecture, which enables stable injection into hydrophobic surface using micropipette only. Reactor temperature needed to PCR reaction is controlled within $\pm 0.5^\circ\text{C}$ by PID controller of LabVIEW software. It is experimentally confirmed that SRY gene PCR by the fabricated microreactor chip is performed for less than 54 min.

1. 서 론

랩온어칩(lab-on-a-chip)은 생명현상을 규명하려는 인간 유전자 연구에 좋은 실험수단으로 인식되고 있다. 유전자 연구를 위한 DNA 분석용 랩온어칩을 구성하기 위해서는, 혈액이나 세포에서 DNA를 추출하는 시료 전 처리 공정, 추출된 DNA를 분석 가능한 양만큼 증폭하는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 공정, 전기영동(electrophoresis) 등을 이용한 반응산물 검출 공정 등이 마이크로바이오칩 상에서 순차적으로

이루어져야 한다. 중합효소연쇄반응을 수행할 수 있는 미세반응조(micro reactor) 형태의 마이크로바이오칩과 모세관 전기영동법(capillary electrophoresis, CE)을 이용한 반응산물 검출용 미세전기영동칩(micro CE chip)에 대한 연구가 주로 이루어지고 있다. 이 중 중합효소연쇄반응 과정은 실험공정의 단순함과 실험을 위한 부가장치들의 구성이 간단하므로 실험 시스템을 소형화하기에 가장 알맞은 생화학적 분석 과정으로 여겨지고 있다.⁽¹⁾ 소형화된 시스템에서는 기존의 것과 달리 실험에 쓰이는 시료의 소모를 줄일 수 있으며, 기존의 것보다 훨씬 작은 열용량으로 인한 빠른 승온 속도와 냉각 속도로 전체 실험 시간을 단축시킬 수 있다. 그리고 손에 들고 다닐 수 있는 휴대용 장치로서의 장점도 지닐 수 있게 된다.⁽²⁾

현재까지 연구된 중합효소 연쇄반응용 바이오칩은 반응수행 방법에 따라 배치형(batch type)과 연속유동형(continuous-flow type)으로 나누어 진다.⁽³⁾

† 책임저자, 회원, 한양대학교 기계공학과
E-mail : ahnym@hanyang.ac.kr
TEL : (031)400-5281 FAX : (031)409-1243

* 삼성전자 통신연구소 통신모듈 Lab.

** 한양대학교 대학원 기계공학과

*** 한양대학교 분자생명과학부

배치형은 반응조에 시료를 주입한 후 반응조를 반응온도로 가열 및 냉각 시키는 방식이며, 연속유동형은 칩 상의 반응온도 히터들 위로 시료를 미세채널을 통해 흘리면서 반응시키는 방식이다. 주로 사용되는 칩 재료는 실리콘 및 유리 기판들(wafer)들과 폴리머 등이다. 제작 용이성과 뛰어난 열적 특성으로 인해 실리콘기판과 유리기판을 같이 사용한 칩이 대부분이다. 실리콘이 가지는 가장 큰 단점인 생화학적 불안정성으로 인해 근래에는 유리기판들만으로 이루어진 칩^(4,5)과 폴리머와 유리기판으로 이루어진 칩^(6,7) 등이 연구되고 있다.

Mann 등⁽⁸⁾은 실리콘이 가지는 생화학적 불안정성을 극복하기 위한 표면 처리 기법 대한 실험적 연구를 수행하였는데, 실리콘/유리 칩의 경우 반응 시료가 들어갈 반응조 내부는 반드시 산화막(SiO₂)과 같은 물리적 피막과 실란(silane) 처리 등을 통한 화학적 피막으로 시료의 안정성을 확보하여야 한다. 그리고 실리콘은 재료 특성 상 곡면 형상을 가지는 형태의 반응조 제작이 어려운 데, 이는 생화학적 안정성에도 문제를 일으킬 여지가 있다.⁽⁹⁾ 유리/유리로 이루어진 칩^(4,5)의 경우 바이오 친화성이 뛰어난 파이렉스(Pyrex) 유리기판을 사용함으로써 시료에 대한 안정성이 확보된다. 하지만 유리는 실리콘 보다 가공이 어려우며, 등방성 식각 성질을 가져서 원하는 형상 가공에 제한이 있다. 그리고 실리콘 보다 비싸다는 것도 단점이다.

실리콘/유리 칩과 유리/유리 칩이 가지는 단점을 보완하고자 연구된 형태의 칩이 폴리머를 이용한 칩^(10,11)이다. 폴리머의 경우 실리콘보다 낮은 열전도도로 인해 빠른 승온속도와 냉각속도 구현이 어렵다는 단점이 있다. 하지만 폴리머를 기반으로 한 칩은 실리콘보다 생화학적 안정성이 뛰어나며 저렴한 재료비로 대량 생산이 가능하다는 장점으로 인해 일회용 바이오칩으로서의 크나큰 잠재력을 지니고 있다.⁽¹²⁾ 폴리머 물질 중 가장 많이 마이크로 바이오칩에 적용되는 재료로는 PDMS (Polydimethylsiloxane)가 있다. PDMS는 일종의 열경화성 수지로서 경화제와 일정 비율로 섞어서 일정 온도에서 열처리를 하면 굳게 된다. 생화학적으로 안정하며, 몰딩(molding)기법을 이용하면 한번의 공정으로 여러 개의 칩이 제작 가능하므로 가격 면에서도 우수하다. 또한 PDMS는 광학적 특성이 우수해서 육안이나 기존의 광학적 검사법을 통해 칩 내부의 관찰이 가능하다는 장점이 있다.

폴리머를 이용한 칩은 실리콘을 기반으로 한 칩보다 낮은 열전도도로 인해 승온속도 및 냉각속도

가 훨씬 떨어지는 성능을 보인다. Yoon 등⁽¹³⁾에 의해 제안된 실리콘을 기반으로 한 칩의 경우 승온속도 및 냉각속도가 시료의 양이 3.6 μ l일 때에 각각 36°C/s, 22°C/s에 이르렀지만, Shin 등⁽¹⁴⁾에 의해 제안된 PDMS 칩의 경우 시료의 양이 2 μ l에 불과하지만 승온속도가 2°C/s, 냉각속도가 1.2°C/s로서 기존의 실리콘 칩에 비하면 현격하게 떨어진다. Shin 등⁽¹⁴⁾에 의해 제안된 칩의 경우 PDMS 자체로만 칩이 구성되었고 칩 바깥쪽에 히터가 있음으로써 히터로부터 시료까지의 열전달 효율이 많이 떨어지는 결점이 있다. 하지만 Hong 등⁽¹⁵⁾에 의해 제안된 PDMS와 유리로 이루어진 이중형(hybrid type) 칩의 경우 시료의 양이 Shin 등⁽¹⁴⁾에 비해 시료의 양이 약 15~25 배나 많은 30~50 μ l임에도 불구하고 승온속도가 2~4°C/s, 냉각속도가 1~3°C/s로 비슷한 성능을 보인다.

폴리머 칩의 경우 폴리머 자체로만 칩을 구성하기 보다는 박막 형태의 히터와 센서가 내장된 유리기판과의 접합을 통해 Hong 등⁽¹⁵⁾에 의해 제시된 바 있는 이중형으로 제작하는 것이 바람직할 것이다. 폴리머 표면의 젖음성(wettability)이 소수성이므로, 폴리머 마이크로채널에서는 친수성 표면처리를 거치지 않고서는 모세관 현상에 의한 간단한 시료주입이 거의 불가능하며, 기포 발생이란 문제가 생길 수 있다.⁽¹⁶⁾ 이 또한 폴리머를 이용한 마이크로바이오칩에서 개선되어야 할 사항이다. 본 연구에서는 별도의 친수성 표면처리 없이도, 일반 생화학 실험실에서 쓰이는 마이크로 피펫(micro pipette)만으로 기포 발생 없이 안정적으로 시료주입이 간단히 이루어지며, 폴리머 칩이 갖고 있는 열적 특성의 단점이 보완된, PDMS/유리 마이크로 중합효소연쇄반응 배치형 칩에 대해 제안하고자 한다.

2. PDMS/유리 바이오칩의 설계 및 제작

2.1 마이크로 반응조

시료를 담게 될 PDMS 칩의 고유 표면 상태가 소수성임을 고려하여 시료가 반응조 내부로 기포 없이 안정적으로 주입될 수 있도록 설계가 되어야 한다. 특히 시료 주입 시 발생할 수 있는 기포는 중합효소연쇄반응의 저해 요소로 알려져 있다.^(13,14) 마이크로 유체역학(microfluidics)이 적용된 시뮬레이션 프로그램을 이용해 제작될 반응조 내의 시료 유동 현상에 대해 해석을 하였고 이를 반응조 형상 설계에 반영하였다. 마이크로 반응조에 시료가 주입될 때에 액상의 시료와 칩 내부에 이미 존재하고 있는 공기와의 경계면인 자유표면

(free surface)의 형성 과정을 해석함으로써 마이크로칩 내의 유체 유동 현상을 시뮬레이션 하였다. 이러한 자유표면 해석에는 VOF(volume of fluids)법을 적용하였으며, VOF가 모듈화되어 있는 CFD-ACE+ (ESI group, France) 프로그램으로 시뮬레이션을 수행하였다. 시료는 탈이온수 (deionized water)로 가정하였으며, 해석 조건으로서 칩 표면의 젖음성은 프로그램 내의 표면 접촉각으로 조정하였다. 소수성은 높은 접촉각(>90°)으로, 친수성은 낮은 접촉각(<90°)으로 설정하였다.

설계된 형상으로 실제 반응조 칩을 제작하여 해석된 결과를 실험을 통해 확인을 하였다. 음성후막감광제 (SU-8)을 이용한 복사형틀법(replica molding)으로 반응조 형상이 구현된 PDMS 칩을 만들고 산소 플라즈마로 표면처리 한 후 유리기판에 접합하여 칩을 완성하였다. 산소 플라즈마 처리과정에서 PDMS 표면이 소수성에서 친수성으로 바뀌게 된다. 본 연구에서 수행한 플라즈마 처리 조건에 따른 젖음성 변화를 접촉각 측정기 (Phoenix 300; S.E.O. Korea)로 알아보았다. 표면처리 직후에는 PDMS 표면의 접촉각이 약 40° 이었으나 시간이 지남에 따라 처리효과가 소멸되어 48시간 이후에는 약 100°로 복원되는 것으로 측정되었다. 따라서 소수성 상태에 대한 실험은 칩 표면을 산소 플라즈마 표면처리한 후 48시간이 지난 다음에, 친수성에 대한 실험은 표면처리 후 1시간 이내에 수행하였다. 실험 시료로는 칩 내부의 유동 현상을 뚜렷이 관찰하고자 빨간색 잉크를 사용하였으며, 주입장치로 실린지 펌프를 이용하였다. 시료의 흐름은 비디오 현미경(Cam Scope, ICS-305A; Sometech Vision, Korea)으로 관찰하였다.

먼저, 많은 연구^(1,2,4,6-8,12-15)에서 사용된 배치형 반응조의 일반적 형상에 대해서 시뮬레이션 해석을 수행하였다. 해석 대상 반응조 형상은 Fig. 1(a)와 같이 시료의 주입구(inlet)와 추출구(outlet)가 반응조 챔버에 연결되어 있다. 반응조의 높이는 100 μm이며, 챔버 폭은 2mm, 주입구와 추출구 폭은 400 μm로 하였다. 챔버 내 주입되는 시료의 양은 10 μl가 되도록 하였다. 시료는 좌측에서 우측 방향으로 0.05m/s의 속도로 흐른다고 가정을 하였으며, 접촉각이 100°와 40°인 경우에 대해서 시뮬레이션을 하였다. 시뮬레이션 결과는 두 경우 모두 기포 발생 없이 챔버가 시료로 채워지는 것으로 해석되었다.

해석 형상대로 칩을 제작하였으며, 시료 주입 실험을 수행하였다. 수 차례의 시료 주입 실험 결과, 칩 내부 벽면이 친수성 일지라도 Fig. 1(b)에서와 같이 시뮬레이션 결과와는 다르게 기포가 생기

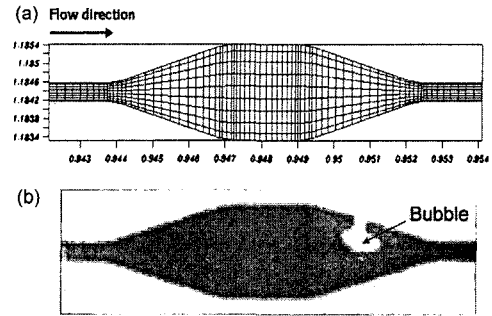


Fig. 1 (a) Simulation model and (b) flow state photograph for chamber type reactor

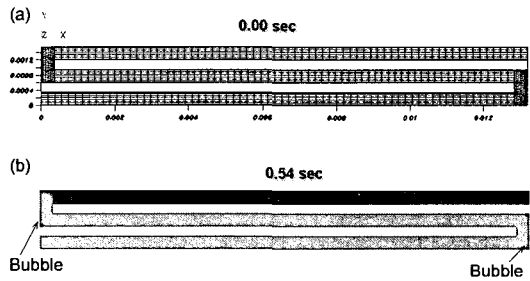


Fig. 2 (a) Simulation model and (b) flow state simulated for rectangular turn channel type reactor

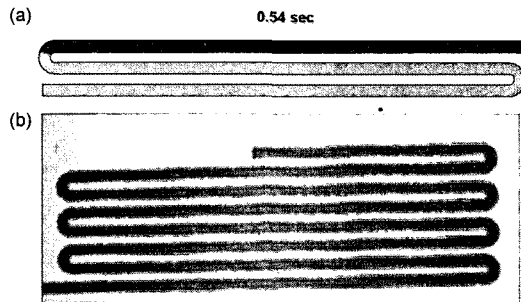


Fig. 3 Flow state (a) simulated and (b) photograph for round turn channel type reactor

는 경우를 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 비록 칩 표면이 친수성이지만 시료 주입 채널을 지난 시료가 반응조 챔버에 들어가면서 채널과 챔버 간의 단면적이 변해 급격히 유속이 감소되었기 때문이 아닐까 생각된다. 반응조 내의 기포들은 중합효소 연쇄반응 시 저해 요소로 작용하므로 다른 형상의 반응조를 설계하였다.

다시 설계된 반응조는 기존의 연속유동형 칩에서만 사용되었던 사선형 채널(serpentine channel) 형태로서,^(3,17) Fig. 2(a)와 같이 폭이 360 μm인 사각 단면 형상의 사선형 미세 채널이다. 시료는 왼쪽

하단부를 주입구로, 오른쪽 상단부를 추출구로 하여 흐르게 된다. 채널 벽면이 친수성일 경우 접촉각을 40°, 소수성일 경우는 100°로 가정하였으며, 유동 속도는 x 축 방향으로 0.05m/s 라고 가정하고 시뮬레이션 해석을 하였다. 시뮬레이션 결과, 표면이 친수성일 경우에는 기포 발생 없이 시료가 주입되었으나, 소수성 경우에는 Fig. 2(b)와 같이 기포가 발생하는 것으로 해석되었다. Fig. 2(b)는 시료가 주입되기 시작한 후 0.54 초 경과된 상태에서, 채널 내 회색 부분이 시료로 채워진 부분이고 검정색 부분은 아직 시료가 채워지지 않은 부분이다. 오른쪽과 왼쪽의 굽어진 부위의 채널 모서리에서 시료가 완전히 채워지지 않고 시료가 주입되고 있다. 시뮬레이션에 의하면 기포 없이 시료 주입이 어려울 것으로 보인다.

참고문헌⁹⁾에 의하면 거칠고 각진 형태 보다는 매끄럽고 둥근 형태의 채널이 보다 나은 생화학적 안정성이 보장된다고 한다. 따라서 반응조 사선 채널의 굽어진 곳을 기존의 각진 형태에서 Fig. 3과 같이 원형 형태로 개선하였으며, 이전의 각진 형태 경우에서와 동일한 조건으로 시뮬레이션을 수행하였다. Fig. 3(a)는 소수성 경우의 해석 결과로서, 표면 젖음성이 친수성일 때뿐 만 아니라 소수성일 때에도 채널 내부가 시료로 빈틈없이 채워지는 것으로 시뮬레이션이 되었다. 둥근 모서리 구조를 가지는 채널 내에서는 유체 흐름에 의한 유체와 기체의 경계면이 채널 내에서 일정하게 유지됨으로써 채널내의 기포가 생성되지 않는다고 보여진다.

해석결과를 확인하기 위해서, 채널의 꺾이는 부분이 등갈게 처리된 사선(蛇線) 채널형 반응조를 Fig. 3(b)와 같이 PDMS 칩으로 제작하였다. 제작된 반응조의 채널 높이는 100 μm, 폭은 360 μm이며, 반응조 채널 내 총 용량은 10 μl이다. 제작된 칩의 주입구와 추출구는 마이크로 피펫에 끼워진 팁(tip) 외경에 맞도록 직경 1mm 펀치로 뚫었다. 생화학 실험실에서 많이 쓰이는 마이크로 피펫을 이용하여 시료를 주입하였으며, 시료의 유량은 정확히 정량화 할 수 없었지만 반복된 측정 결과 평균적으로 35~40 μl/min 이었다. 소수성과 친수성 두 경우 모두 동일한 반복 실험 결과 모든 칩에서 기포 없이 시료가 채워졌다. Fig. 3(b)는 PDMS 칩 표면이 소수성 상태일 때 반응조 채널 내에 시료가 실제 빈틈없이 차지는 것을 보여주고 있다. 실험을 통해 개선된 사선 채널형에서는 PDMS 칩을 번거롭게 친수성 표면처리를 안 해도 기포 발생없이 시료 주입을 할 수 있음을 확인하였다. 그리고 생화학 실험에서 시료의 주입 및 추출 과정을 일반

적으로 실험자가 마이크로 피펫을 가지고 간단히 수동으로 실행하는 것과 같이, 마이크로칩에서도 일정 속도 주입이 가능한 실린지 펌프와 같은 장치를 사용하지 않고 사람 손으로 유속이 불규칙하게 주입하더라도 기포 없이 정량의 시료를 채울 수 있다는 점도 개선된 사선 채널형 반응조의 장점이라 할 수 있겠다.

2.2 마이크로 히터 및 온도센서

중합효소연쇄반응은 유전자 복제법으로써 시료 내 특정 유전자 단일서열을 증폭하여 겔 전기영동에 의하여 감식될 수 있을 정도로 대량 복제시킨다. 반응에는 중합효소를 사용하며 반응온도가 다른 3 단계 연쇄반응을 주기적으로 순환 반복하여 유전자를 복제하게 된다. 원활한 유전자 복제를 위해서는 반응에 필요한 정확한 온도로 시료를 가열과 냉각을 해야 한다. 본 연구에서는 유리기판에 금속 박막을 증착하여 박막형 저항체를 제작한 후 이를 히터와 온도센서로 활용하였다. 히터와 센서 제작을 위해 유리 (Pyrex7740, Dow Corning, U.S.) 기판에 열기상 증착법(thermal evaporation)으로 크롬과 금을 각각 200Å/1000Å 두께로 증착시킨다. 사진식각(photolithography) 기법을 이용해 설계된 형상으로 패터닝을 한 후 시료와 히터와의 생화학적 및 전기적 절연을 위해 강화 화학기상증

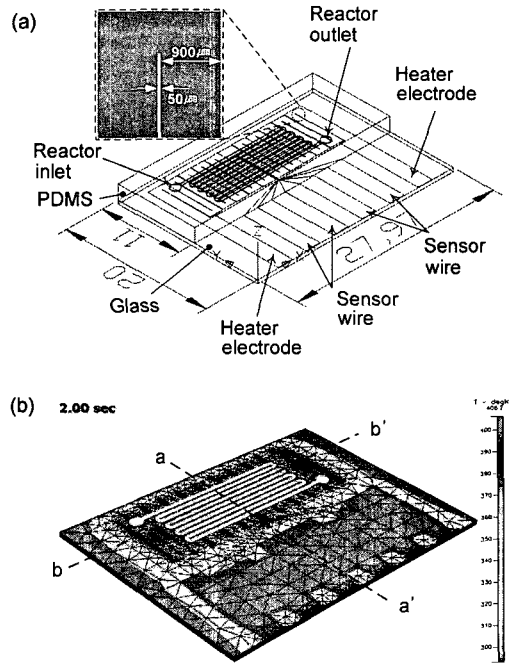


Fig. 4 (a) Schematic of micro PCR chip and (b) simulated thermal profile of chip inner surface after 2 sec

착(PECVD)법을 이용해 산화막(SiO₂)을 1 μm 두께로 증착한다. 제작된 칩은 O₂ 플라즈마 처리를 통해 PDMS 반응조 칩과 접합하게 된다.

전압 구동방식의 박막형 마이크로 히터를 Fig. 4(a)와 같이 설계하고, CFD-ACE+ 해석 프로그램으로 열전달 시뮬레이션을 수행하였다. 해석 조건으로 히터 인가전압은 25V, 히터저항은 100Ω, 열유속(heat flux)은 30997.3W/m², 초기 온도는 20℃로 가정하였다. 그리고 탈이온수, PDMS, 유리, SiO₂ 들의 열전도율은 0.613, 0.17, 1.13, 1.4 W/m·K로 하였다. 열전달 해석은 0.1 초씩 총 5 초를 수행하여, 시간대별 칩의 온도 변화 양상을 지켜보았다. Fig. 4(b)는 히터에 전압을 인가하여 2 초 후의 반응조 내부 면의 온도 분포 시뮬레이션 결과이다. 그 밖에 반응조 내 시료의 승온속도에 가장 큰 영향을 미치리라 여겨지는 히터 인가전압과 히터저항 두 변수값을 바꿔가며 해석을 해 보았다. 히터저항이 작을수록, 인가전압이 높을수록 승온속도가 빠르게 되는 것으로 해석되었다. 따라서 저항을 작게 하기 위해 히터 저항선이 되도록 넓은 단면을 가지도록 Fig. 4(a)에 별도 도시한 것과 같이 히터 저항체선의 폭을 900 μm, 저항체 선간 간격을 50 μm로 결정하였다. 이 경우 승온속도가 약 25℃/s로 해석되었다.

히터가 PDMS 반응조와 직접 만나는 유리칩 윗면에 있을 경우와, 반대로 유리칩 아랫면에 있을 경우에 대해서 시뮬레이션을 수행하였다. 시뮬레이션을 통해 반응조 내부의 시료 온도 균일도를 v 폭방향(a-a')과 길이방향(b-b')으로 분석하였다[Figs. 4(b) and 5]. 히터가 PDMS 반응조 칩면과 직접 접촉된 경우가 그렇지 않을 경우보다 반응조 내의 폭방향으로 온도 차가 적음을 알 수 있었다[Fig. 5(a)]. 하지만 길이방향으로의 온도 균일도는 반대로 해석되었다[Fig. 5(b)]. 대체로 폭방향 방향의 온도 분포 균일도가 길이방향 보다 나은 것으로 해석되었다. 반응조 평균 온도는 히터가 반응조 칩에 직접 접촉될 경우가 아닐 경우 보다 5℃ 정도 높았으나 승온속도는 거의 차이가 없게 나왔다. 해석된 승온속도는 약 25℃/s 이므로 5℃ 온도차는 목표 온도에 도달되는 데에 계산상으로 단지 0.2 초 정도의 시간 차이만 있게 된다. 그리고 사선 채널 형태 반응조 내에 놓여질 각 시료 위치마다의 온도가 평균 온도를 기준으로 최대 ±1.5℃ 정도의 편차로 분포되는 것으로 해석되었다. 실제 중합효소연쇄반응 실험에서는 제작된 칩에 전압 인가 및 센서에서 나오는 신호를 받기 위한 연결부 역할을 하는 슬롯이 부착되므로, 칩에서 슬롯으로의 열전달을 고려하지 않은 시뮬레이션 결과

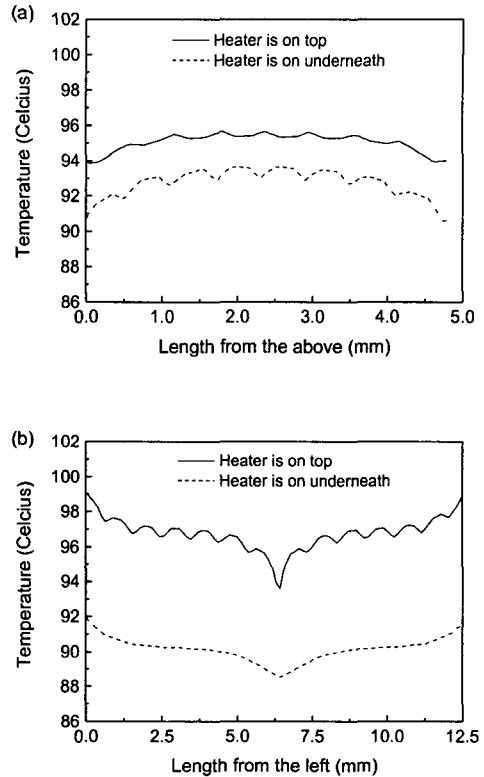


Fig. 5 Temperature distribution of chip inner surface in (a) latitude (a-a') and (b) longitude (b-b') directions

는 실제 실험에서와 차이가 있겠다.

시료의 온도를 측정하기 위해 4 선식 측온 저항체(resistance temperature detector, RTD)를 이용하였다. 4 선식 방법은 정전류(0~20mA) 입력용 2 가닥, 전원(DC) 신호 출력용 2 가닥의 전선들이 저항체에 연결되며, 온도에 따라 저항이 변화되는 저항체에 정전류를 공급하여 변화된 저항에 비례하는 전압을 출력시킨다. 온도센서 저항체는 반응조 중앙부위의 히터 저항선들 사이에 놓이게 설계하였다[Fig. 4(a)]. 반응조칩에 내장된 박막 측온 저항체 센서를 온도센서로 활용하기 위해 온도 변화에 따른 저항값 변화를 알아보는 실험을 하였다. 온도 변화는 일반 대류 오븐을 이용하였으며 칩은 슬롯에 고정된 채 오븐 안에 놓고 실험하였다. 저항값 측정 부위에 위치한 슬롯 연결 단자에 멀티미터(Fluke 189, U.S.A)를 연결하고 40℃부터 90℃까지 10℃씩 온도 변화를 주어가며 박막형 온도 센서의 저항값 변화를 살폈다. 실험은 10 개의 칩에

동일한 실험 방법이 적용되어 실행되었으며 그 결과 실험 된 칩 모두 온도-저항값 관계가 선형적이었으며 신뢰도가 거의 1에 가깝게 나왔다. 마이크로 온도센서의 신뢰성을 알아보기 위해 일정 온도에서 시간 변화에 따른 저항값 변화를 알아보니 1시간이 지나는 동안 저항값 변화가 없었음을 알 수 있었다. 실험 데이터를 이용하여 실제 반응조 칩 내의 시료 온도 측정을 수행하였다.

2.3 중합효소연쇄반응용 마이크로칩 시스템

최종 제작된 마이크로칩은 Fig. 6 과 같으며, 유리칩의 전체 크기는 28mm × 20mm 이고, PDMS 칩은 27mm × 11mm 이다. 제작된 칩들의 히터 저항은 측정결과 60~70Ω 이었다. 중합효소연쇄반응의 온도 제어를 위해 시스템을 구성하였다. 전원 공급기 (E3631A, Agilent Technology, U.S.)를 통해 히터 저항체에 일정량의 전압을 공급하고, 온도센서에서 나오는 미약한 전압을 신호처리기 (SC2345, National Instrument, U.S.)로 증폭하여 데이터 수집보드 (PCI-6024E, National Instrument, U.S.)를 통해 컴퓨터에 전달하였다. 전달된 전압값으로 온도를 계측하고 원하는 반응조 온도에 맞게 히터 전압을 조정하는 일련의 제어 과정은 컴퓨터 내의 LabVIEW 7.0 (National Instrument, U.S.) 소프트웨어에 의해 수행하였다. 제어방식은 LabVIEW의 PID 제어 모듈을 이용하였다.

중합효소연쇄반응의 주기적인 온도 순환 과정이 온도제어 시스템으로 잘 구현되는 것을 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 시료와 히터간의 전기적 절연을 위해 히터 금속 저항체위에 증착한 산화막이 실험 중 벗겨지는 경우가 생겼다. 산화막이 시료와의 화학 반응에 의해 벗겨지면 저항체가 시료와 맞닿아 타버리는 현상이 발생했다. 이런 현상 때문에, 히터와 센서가 있는 면이 유리기판 밑으로 오고 반대면이 반응조 PDMS 칩과 직접 접촉 되도록 칩을 제작하여 실제 중합효소 연쇄반응을 수행하게 되었다. 우선 시료대신 탈이온수를 마이크로칩에 채워놓고, 전원 공급기와 신호 처리기가 연결된 슬롯(Hirose Korea)에 칩을 장착하였다. 칩에 들어가게 되는 시료의 총량은 9~10 μl 정도이다. 시료의 온도가 물의 끓는 점 가까이인 94℃까지 올라가므로 부피 팽창으로 인한 시료의 누수를 방지하기 위해 시료 주입 후 중합효소연쇄반응용 테이프와 얇은 아크릴판을 칩 위쪽에 부착하고 클립으로 고정하였다.

Fig. 7 은 실험결과로서, 중합효소연쇄반응 과정의 온도 설정값과 실제 시료의 온도 변화를 나타낸다. 시료의 온도가 각각 설정된 온도와 대체로

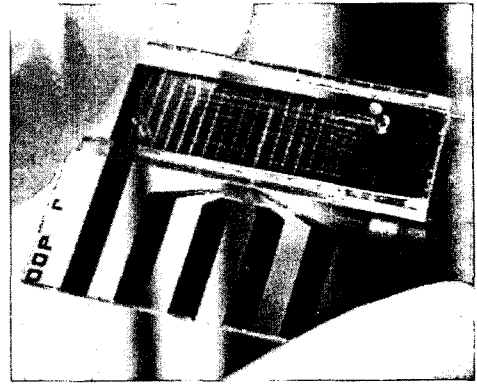


Fig. 6 Photograph of fabricated PDMS/glass microbiochip

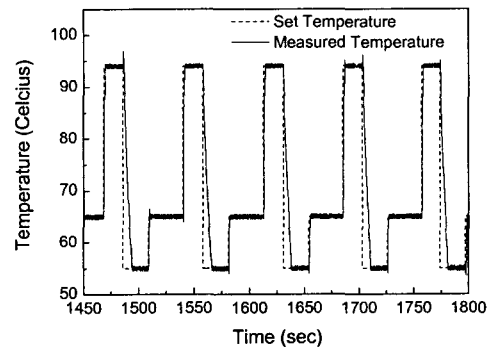


Fig. 7 Thermal cycling of fabricated microbiochip controlled by LabVIEW feedback controller

±0.5℃이내의 오차만을 가짐을 알 수 있었다. 승온 및 냉각속도는 12~21℃/s, 5~6℃/s 가량 되었다. 승온 및 냉각 속도는 시료의 열용량, 즉 시료의 양과 반비례하므로 다른 논문의 칩에서 쓰인 시료의 양이 각기 다른 상황에서 칩 성능 비교 기준으로 삼기엔 무리가 있지만, 승온 및 냉각 속도만을 두고 보았을 때 기존에 연구되었던 폴리머를 이용한 다른 칩보다 뛰어나거나 혹은 그렇지 못하기도 하다. Hsu 등⁽¹⁸⁾에 의하면 승온속도가 증가됨에 따라 중합효소연쇄반응 효율은 증가하지만, 속도가 5℃/s 이상이 되면 반응 효율 증가가 미약해진다. 따라서 제작된 칩은 반응 효율에서는 기존 칩들과는 큰 차이가 없겠지만, 중합효소 연쇄반응에 필요한 총 시간은 실리콘 칩들에 비해 길어지는 단점이 있겠다.

Table 1 Sample composition for SRY gene PCR. (Total volume; 13 μ l)

| Component | Quantity (μ l) |
|---------------------------------|---------------------|
| Nuclease free water | 5.22 |
| 10X Buffer | 1.3 |
| dNTP | 1.08 |
| Primer SRY F | 0.5 |
| Primer SRY R | 0.5 |
| Additive [BSA] | 0.9 |
| Template(100ng/ μ l) | 2.5 |
| Taq polymerase (5unit/ μ l) | 1.0 |

3. 중합효소 연쇄반응 실험

제작된 마이크로바이오칩의 성능 평가를 위해 선택된 유전자를 가지고 중합효소 연쇄반응용 일반기계(Primus 96 Thermocycler; MWG, U.S.)와 마이크로칩을 이용한 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 마이크로 스케일에서는 체적에 비해 표면적이 차지하는 비율이 커서 관성력에 비해 표면장력의 영향이 커지게 된다. 따라서 마이크로 칩 내에서는 중합효소 연쇄반응 액에 들어있는 중합효소 (polymerase), 시발체(primer), 유전자 등이 칩 내부 표면에 흡착되기 쉽게 된다. 이러한 경우 중합효소 연쇄반응의 효율이 저하되므로 칩 내부의 표면 처리를 통해 이러한 흡착을 방지하여야 할 필요가 있다.⁽³⁾ 본 논문에서는 BSA (Bovine Serum Albumin)를 첨가제로 넣어 첨가제가 시료내의 효소와 유전자 등에 비해 먼저 칩 표면에 흡착하여 다른 생화학 시료의 흡착을 방지 하는 능동적 표면 처리법 (dynamic coating)을 이용하였다.

남성 불임 유전자 진단에 사용되는 남성 Y 염색체에 존재하는 SRY (sex determining Y chromosome) 유전자를 대상으로 실험을 수행하였다. Table 1은 실험에 사용된 시료의 조성이다. 칩에서의 중합효소연쇄반응 주기는 먼저 94 $^{\circ}$ C 240초 (predenature) 1회, 그리고 94 $^{\circ}$ C 15초 (denature), 55 $^{\circ}$ C 15초 (annealing), 65 $^{\circ}$ C 30초 (extension)를 35회 순환반복 후 마지막으로 65 $^{\circ}$ C 300초 (post-extension) 1회 수행이었으며 사용된 시료의 양은 10 μ l이다. 일반 중합효소연쇄반응 주기는 먼저 94 $^{\circ}$ C 900초 1회, 그리고 94 $^{\circ}$ C 60초, 55 $^{\circ}$ C 90초, 65 $^{\circ}$ C 90초, 35회 순환반복 후 마지막으로 65 $^{\circ}$ C 600초 1회 이었으며 사용된 시료의 양은 100 μ l이다. 중합효소 연쇄반응에 걸린 총 시간은 마이크로칩에서는 53분 23초가 그리고 일반기계에서는 194분 46초가 각각 소요 되었다.

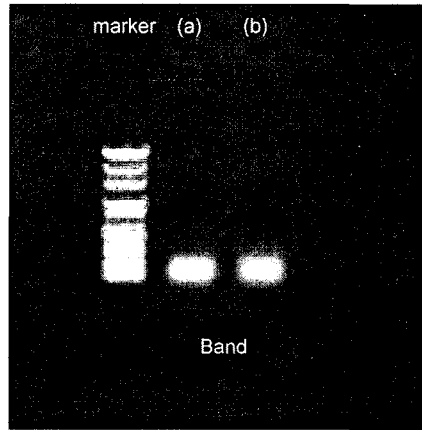


Fig. 8 Photograph of gel electrophoresis after SRY gene PCR (a) by PDMS/glass micro reactor (b) by conventional method

각각의 반응 실험을 마친 시료 결과물들은 전기영동으로 확인하였다. 전기영동은 2% 아가로 우즈겔(agarose gel)을 100V 로 20분간 수행했으며, 그 결과를 찍은 사진은 Fig. 8과 같다. 먼저 인덱스 마커(marker)을 기준으로 볼 때에, 유전자 복제가 칩과 일반기계 상에서 동일하게 이루어졌음을 보여주고 있다. 겔 전기영동 사진에서 유전자 띠(band) 형상의 뚜렷함 정도로 중합효소 연쇄반응 효율에 관한 정성적인 비교 분석을 할 수 있는데, Fig. 8로부터 칩에서의 중합효소 연쇄반응 결과가 일반기계에서의 결과랑 차이가 없음을 알 수가 있다 따라서 제작된 마이크로칩을 이용하면 일반 실험실 기계보다 적은 시료로 짧은 시간 내에 중합효소 연쇄반응에 의한 유전자 대량복제가 가능함을 확인할 수가 있다.

4. 결론

본 논문은 중합효소 연쇄반응용인 배치형 PDMS/유리 마이크로 바이오칩을 설계, 제작 하였으며 제작된 칩에 생화학 반응에 필요한 열 에너지를 공급하기 위한 온도 제어 시스템을 구축하였다. 실리콘 대신 PDMS 를 재료로 사용함으로써 칩 제작 공정을 단순화 시켰다. 이로 인해 칩의 제작 단가를 낮출 수 있었으며 향후 일회용 바이오칩으로서의 가능성을 가질 수 있다. 특히 칩 표면의 젖음성에 상관없이 시료를 기포 없이 안정적으로 주입할 수 있게, 채널의 꺾이는 부분이 등갈게 개선된 사선 채널형 반응조칩 형상을 해석 시뮬레이션을 통해 설계하였고 이를 실험적으로 입증하였다. 이는 기존의 PDMS 칩 들이 원활한 시

료 주입을 위해 칩 표면을 친수성 처리하는 과정을 생략할 수 있으므로 칩 제작 비용 및 제작 과정에 드는 시간을 줄일 수 있었다. SRY 유전자 증합효소 연쇄반응 실험을 통해 제작된 칩과 온도 제어 시스템의 성능을 검증하였다. 제작된 칩을 이용하여 기존 생화학 실험실에서 100 μ l 시료로 195 분 가량 소요되던 증합효소 연쇄반응을 10 μ l 시료만으로 54 분 이내로 단축 수행할 수 있었다.

후 기

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었으며(KRF-2003-041-D00105), 이에 관계자께 감사드립니다.

참고문헌

- (1) Northrup, M. A., Gonzlaez, C., Hadley, D., Hills, R. F., Landre, P., Lehew, S., Saiki, R., Sninsky, J. J., Watson, R. and Watson, R. Jr., 1995, "A MEMS-based Miniature DNA Analysis System," *The 8th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators and Eurosensors IX*, Stockholm, Sweden, pp. 764~767.
- (2) Daniel, J. H., Iqbal, S., Millington, R. B., Moore, D. F., Lowe, C. R., Lesile, D. L., Lee, M. A. and Pearce, M. J., 1998, "Silicon Microchambers for DNA Amplification," *Sensors and Actuators (A)*, Vol. 71, pp. 81~88.
- (3) Kricka, L. J. and Wilding, P., 2003, "Microchip PCR," *Anal Bioanal Chem*, Vol. 377, pp. 820~825.
- (4) Kopp, M. U., de Mello, A. J. and Manz, A., 1998, "Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR in a Chip," *Science*, Vol. 280, pp. 1046~1048.
- (5) Sun, K., Yamaguchi, A., Ishida, Y., Matsuo, S. and Misawa, H., 2002, "A Heater-Integrated Transparent Microchannel Chip for Continuous-Flow PCR," *Sensors and Actuators (B)*, Vol. 84, pp. 283~289.
- (6) Fujii, T., 2002, "PDMS-Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications," *Microelectronic Engineering*, Vol. 61~62, pp. 907~914.
- (7) Koh, C. G., Tan, W., Zhao, M.-Q., Ricco, A. J. and Fan, Z. H., 2003, "Integrating Polymerase Chain Reaction, Valving, and Electrophoresis in a Plastic Device for Bacterial Detection," *Analytical Chemistry*, Vol. 75, pp. 4591~4598.
- (8) Hong, J. W., Fujii, T., Seki, M., Yamamoto, T. and Endo, I., 2001, "Integration of Gene Amplification and Capillary Gel Electrophoresis on a Polydimethylsiloxane-Glass Hybrid Microchip," *Electrophoresis*, Vol. 22, pp. 328~333.
- (9) Madou, M. J., 2002, *Fundamentals of Micro Fabrication*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 510~512.
- (10) Choi, J.-Y., Ahn, Y. and Hwang, S.-Y., 2006, "PDMS/Glass Based DNA Microbiochip for Restriction Enzyme Reaction and Electrophoresis Detection," *Trans. of the KSME (A)*, Vol. 30, No. 1, pp. 26~31.
- (11) Lee, S.-W., Ahn, Y. and Chai, Y.-G., 2004, "Microfilter Chip Fabrication for Bead-Based Immunoassay," *Trans. of the KSME (A)*, Vol. 28, No. 9, pp. 1429~1434.
- (12) El-Ali, J., Perch-Nielsen, I. R., Poulsen, C. R., Bang, D. D., P. and Wolff, T. A., 2004, "Simulation and Experimental Validation of a SU-8 Based PCR Thermocycler Chip with Integrated Heaters and Temperature Sensor," *Sensors and Actuators (A)*, Vol. 110, pp. 3~10.
- (13) Yoon, D. S., Lee, Y.-S., Lee, Y., Cho, H. J., Sung, S. W., Oh, K. W., Cha, J. and Lim, G., 2002, "Precise Temperature Control and Rapid Thermal Cycling in a Micromachined DNA Polymerase Chain Reaction Chip," *Journal of Micromechanics and micro-engineering*, Vol. 12, pp. 813~823.
- (14) 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," *Journal of Micromechanics and micro-engineering*, Vol. 13, pp. 768~774.
- (15) Cheng, J., Shoffner, M. A., Hvichia, G. E., Kricka, L. J. and Wilding, P., 1996, "Chip PCR. II. Investigation of Difference PCR Amplification Systems in Microfabricated Silicon-Glass Chips," *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, pp. 380~385.
- (16) Cho, W., Ko, Y.-J., Ahn, Y., Yoon, J.-Y. and Cho, N.G., 2006, "Surface Modification Effect of Wettability on the Performance of PDMS-Based Valveless Micropump," *Key Engineering Materials*, Vols. 326-328, pp. 297~300.
- (17) Zhao, Y. and Zhang, X., 2005, "A Novel Pressure Indicator for Continuous Flow PCR Chip Using Micro Molded PDMS Pillar Arrays," *Mater. Res. Symp. Proc.* Vol. 845, pp. AA5.10.1~AA5.10.6.
- (18) Hsu, J. T., Das, S. and Mohapatra, S., 1997, "Polymerase Chain Reaction Engineering," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 55, No. 2, pp. 359~366.