

## Fabrication of Biochip Using Gray-scale Photolithography

裴映玟<sup>†</sup>

(Young Min Bae)

**Abstract** - Biochip, which implements bioanalytical process on a tiny surface, is one of candidates for medical diagnosis, drug screening, and molecular sensing. In general, a type of biochip based on microfluidics is composed of microcomponents including microchannel, pump, and valve, which require complicated processes. In this study, gray-scale photolithography(GSPL) was applied to fabricate a biochip with multiple layers. A mould for casting PDMS (polydimethylsiloxane) channel, was fabricated using GSPL. A gray-photomask was prepared by printing gray patterns on a high-quality glossy paper followed by photoreducing by 10 : 1 onto the photo-film. The formation of multiple layers was studied according to the change of gray level of pattern and the developing time. A biochip composed of a weir(multiple layer structure) and a reaction chamber in a single microchannel was fabricated in a glass plate. Finally, we investigated the application of biochip to antigen-antibody reaction by packing the microbead coated with antibody.

**Key Words** : Biochip, Microfluidics, Gray-scale Photolithography, Microbead

## 1. 서 론

미세유체공학(microfluidics)은 수나노 리터 볼륨의 미세 유체의 제어에 관한 기술로서, 이를 통해, 마이크로미터 크기의 채널(channel), 펌프(pump), 혼합기(mixer), 검출기(detector) 등 미세 유체 제어를 위한 구성 요소들을 개발할 수 있다[1]. 바이오칩은 수  $\text{cm}^2$  크기의 칩 위에 각종 미세 유체 제어를 위한 구성 요소들이 집적된 시스템으로써, 미세 가공 기술의 적용을 통해 제작된다. 바이오칩은 기존의 생화학 실험실에서 이루어지고 있는 벤치탑(bench-top) 크기의 분석기기에 의한 작업을 대체할 수 있는 기술로서, 다음과 같은 장점들을 제공한다; 1) 분석 시간의 단축, 2) 낮은 분석 비용, 3) 자동화, 4) HTS (high-throughput system). 바이오칩은 의학 및 U-healthcare 시스템에서의 분자 인식 및 검출에 의한 진단, 제약 산업에서의 신약 탐색, 환경 및 식품 분야에서의 안전성 평가 등에 적용할 수 있는 기술로 떠오르고 있다[2]. 이에 따라, 이화학적 분석을 수행할 수 있는 다양한 형태의 바이오칩들이 발표되고 있다. 예로써, DNA의 고감도 검출을 위한 PCR(polymerase chain reaction), 항원-항체 반응 등이 칩 위에서 구현되었다[3].

바이오칩의 제작 공정은 유리, 실리콘, 고분자 등의 재료를 적절히 가공하여, 칩 위에 집적하는 공정으로 이루어지며, 이들 공정 대부분은 미세 가공(micro-machining)기술을

기반으로 하여 이루어진다. Photo-lithography와 식각(etching)이 대표적이다. 특히, PDMS(polydimethylsiloxane)와 같은 고분자를 이용한 공정은 유리 및 실리콘 등을 이용한 공정에 비해 바이오칩의 설계 및 제작이 간단하고, 실험실 수준에서의 적용이 용이하기 때문에, rapid-prototyping 방법으로 널리 활용되고 있다. PDMS를 이용한 바이오칩 제작 공정 순서가 그림 1에 나와 있다[4]. Photo-resistive(PR)막을 고체 기판 위에 형성한 후에, photo-lithography를 이용하여 PR 막의 패턴을 형성시킴으로써, 바이오칩의 제작을 위한 주형(mould)를 제작한다. 최종적으로 제작된 주형을 통해 다량의 바이오칩을 간단히 제작할 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 높이가 서로 다른 마이크로채널을 가지는 바이오칩을 제작하는 데는 한계가 있다. 이를 극복하기 위해서, 주형의 제작 과정에서 PR 막의 형성 및 photo-lithography의 반복 적용이 보고되고 있지만, 매 공정마다 포토마스크의 정확한 정렬이 요구되며, 이를 위해서는 추가적인 장비와 숙련된 기술이 확보되어야 한다.

이러한 일반적인 PDMS 기법의 제약을 해결하기 위한 방법으로, gray-scale photo-lithography(GSPL)이 적용될 수 있다[5]. GSPL를 통해, 1회의 photo-lithography를 통해 다층 구조를 가지는 마이크로채널을 제작할 수 있다. 이를 위해서는 회색 명암의 패턴이 형성된 포토마스크의 제작이 필요하며, 회색 명암의 정도에 따른 다층 구조의 형성에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에는 GSPL을 이용한 바이오칩의 제작 가능성을 연구하였다. 특히, 마이크로비드를 항체 고정화를 위한 기판(substrate)로 활용하였으며, 이는 높이가 다른 채널 부분(weir)을 가지는 바이오칩의 구조를 요구한다. 여기서는, 실험실 수준에서 접근하기 위한 용이한 회색 명암 패턴의 포

<sup>†</sup> 교신저자, 正會員 : 韓國電氣研究院 先任研究員 · 工博

E-mail : kimbym@keri.re.kr

接受日字 : 2007年 8月 29日

最終完了 : 2007年 11月 19日

토마스크의 제작 방법을 통해, 다층 구조의 형성을 확인하였다. 그리고, GSPL을 이용하여 다층 구조의 바이오칩을 제작하였으며, 최종적으로 바이오칩 내에서의 항원-항체 반응 구현의 가능성을 확인하였다.

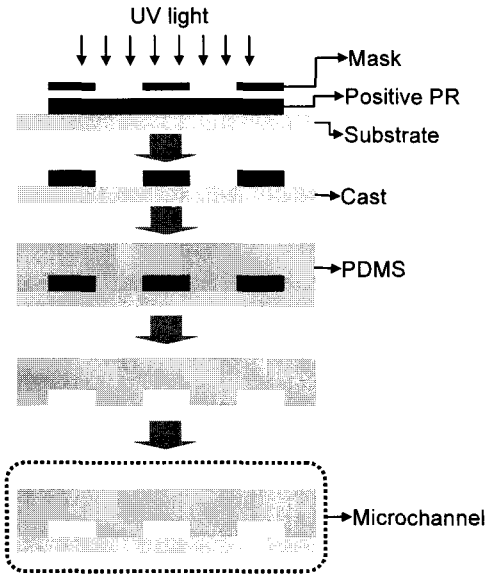


그림 1. PDMS를 이용한 마이크로채널 조립 공정  
Fig. 1. Conventional fabrication of microchannel using PDMS

## 2. 본 론

### 2.1 Gray-scale photolithography의 개념

그림 2는 gray scale photolithography(GSPL)의 개념을 보여 주고 있다. 회색 명암의 패턴이 형성된 포토마스크를 이용하여 노광 공정을 수행한다. 회색의 명암 정도에 따라 투과되는 광량이 조절되며, 이를 통해 PR 막의 광화학 반응을 조절한다. 결과적으로, 현상 공정(developing process)에서 제거되는 PR막의 두께를 제어할 수 있으며, 이를 통해, 다층 구조의 패턴(multiple layer pattern)을 조립할 수 있다. GSPL 공정 수행을 위해서는 일반적으로 양성 PR 막이 이용된다. 또한, 투과되는 광량을 고르게 하기 위해서는, 공간적으로 일정한 명암 패턴의 제작이 필수적이다. 단순히 프린터를 이용한 회색 명암 패턴의 출력은, 회색 명암이 미세한 점들의 밀도에 의해서 결정된다는 점에서 제약을 가진다. 회색 명암 포토마스크의 제작을 위한 방법들이 보고되고 있다. 한 예로써, Chen 등은 제작하고자 하는 패턴의 형태를 가지는 마이크로채널을 제작하고 채널 내에 명도를 가지는 수용액을 채움으로써 회색 명암을 가진 포토마스크를 제작하였다[6]. 2층 구조의 패턴을 제작하는 데는 성공하였으나, 그 이상의 다층 구조의 제작에 있어서는 제약을 가지고 있다. Wu 등은 마이크로채널의 100배 확대한 회색 명암의 포토마스크를 제작하였으며, reduction photolithography를 이용하여 수 $\mu$ m 범위에서의 3차원 구조를 가지는 미세 구조물을 제작하였다.

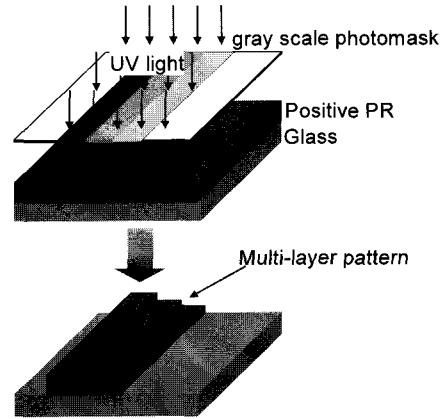


그림 2. Gray-scale photolithography의 개념  
Fig. 2. Concept of gray-scale photolithography (GSPL)

본 연구에서는 잉크젯 프린터로 출력된 패턴을 다시 축소 시킴으로써, 프린터에 의한 회색 명암의 포토마스크 제작의 문제점을 해결하고자 하였다. 상용 그래픽 소프트웨어를 이용하여 회색 포토마스크의 패턴을 제작하였으며, 잉크젯 프린터를 이용하여 사진인화용지(high quality glossy paper)에 출력하였다. 출력된 패턴은 사진용 필름 (Kodak P recision Line Film LPDA)이 장착된 카메라를 이용하여 10:1 축소 촬영하였다. 최종적으로 현상된 필름을 회색 명암 포토마스크로 사용되었다.

### 2.2 GSPL 공정

앞에서 언급한 회색 명암 포토마스크를 이용한 GSPL 공정의 가능성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. GSPL의 공정은 회색 명암 포토마스크를 이용한다는 점을 제외하고, 그림 1에 제시된 바와 동일하다. 양성 PR(AZ P4620, Clariant Co., USA)의 막을 1300rpm에서의 스핀 코팅 (spin-coating)과 베이킹 (baking) 공정을 통해, 현미경용 슬라이드 글라스 기판 위에 형성시켰다. 박막의 두께를 증가 시키기 위해서 박막 공정을 2회에 걸쳐 반복 적용하였다. 최종적으로 형성된 양성 PR 막의 두께는  $24.5\mu\text{m} \pm 0.6$ 이었다. 슬라이드 글라스 기판 위에 형성된 박막은 앞에서 제작된 회색 명암 포토 마스크를 통해 UV에 90초 동안 노출되었으며, 현상액(AZ421K, Clariant Co., USA)을 이용하여 패턴을 형성하였다. 최종적으로, 증류수를 이용하여 잔여 현상액을 철저히 제거하고 건조시켰다.

그림 3은 회색 명암 및 현상 시간에 따른 GSPL을 이용한 PR 막의 두께 제어에 관한 결과를 보여 준다. 제거 두께 (Removed thickness)는 초기 PR 막의 두께와 공정 후의 PR 막의 두께 차이로 계산하였다. 30, 50, 그리고, 70%의 회색 명암의 패턴을 가지는 포토마스크를 각각 제작하였으며, GSPL을 수행하였다. 명암도는 100%를 검정으로 하고 0%를 투명으로 하여 계산된 결과이다. 30%의 회색 명암 패턴에 노출된 PR 막의 경우, 대부분이 제거됨에 따라 두께의 측정이 불가능하였다. 그림 3으로부터, 명암이 증가함에 따라 제거 두께(removed thickness)가 감소하는 것을 확인하였다. 이는 높은 명암에서 투과되는 UV의 양이 감소하기

때문인 것으로 해석된다. 그리고, 현상 시간이 길어짐에 따라 미세한 제거 두께의 증가가 관찰되었다. 본 실험은 다층 구조의 두께는 회색 명암과 현상 시간의 변화를 통해 제어할 수 있음을 말해 준다.

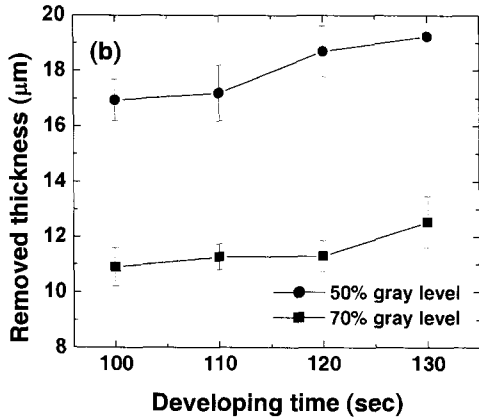


그림 3. 회색 명암 및 현상 시간에 따른 제거되는 PR의 두께 변화

Fig. 3. Change of removed thickness of PR according to gray scale level and developing time.

2.3 바이오칩 조립

최근 마이크로비드(microbead)를 이용한 바이오칩의 개발이 지속적으로 보고되고 있다[7]. 마이크로비드를 이용한 바이오칩은 효소 반응, DNA의 hybridization 반응, 항원-항체 반응에 성공적으로 적용되고 있다. 특히, 항원-항체 반응은 진단, 병원균 검출 등에 널리 활용될 수 있다. 마이크로비드를 이용한 항원-항체 반응용 바이오칩을 제작하기 위해서는 항체와 같은 분자 인식 물질이 코팅된 마이크로비드를 그림 4와 같이 바이오칩의 반응 챔버(reaction chamber)내에 채워야 하며, 이를 위해서, 댐(dam) 구조의 웨어(weir)를 반응 챔버 출구 쪽에 형성시켜야 한다. 반응 챔버 내에 마이크로비드를 채우기 위해서는 웨어 영역에서의 마이크로채널 높이가 마이크로비드의 직경보다 낮게 제작되어야 한다. 이러한 다층 구조의 마이크로채널 제작을 위해서는, 일반적으로 복잡한 photolithography 공정이 요구된다[8].

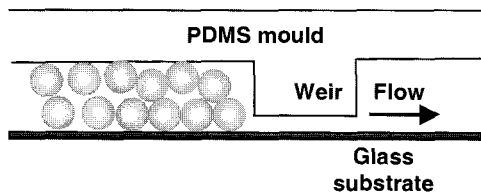


그림 4. Microbead를 이용한 LOC

Fig. 4. Microbead-based LOC

본 연구에는 GSPL 공정을 이용하여 1회 공정으로 다층 구조의 마이크로채널을 제작하고자 하였다. 그림 5와 같은 마이크로채널의 패턴을 디자인하였다. 입구(inlet)와 출구(outlet), 그리고, 보조 출구(auxillary inlet), 그리고, 반응 챔버 등으로 구성되며, 반응 챔버의 출구에 웨어(weir)가 형성되어 있다. 채널의 폭은 100μm, 반응 챔버의 크기는 150μm x 150μm로 설정하였다. 보조 출구는 마이크로비드를 반응 챔버 내에 채우는 과정에서 압력을 조절하기 위해서 추가되었으며, 바이오칩의 반응 실험에서는 바늘을 이용하여 막은 상태에서 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 9.95μm의 직경을 가지는 마이크로비드(Bangs Lab. Co., USA)를 사용하고 하였다. 따라서, 출구 쪽으로의 누출 없이 마이크로비드를 반응 챔버에 채우기 위해서는, 반응 챔버 및 마이크로채널의 높이는 마이크로비드보다 높아야 하며, 웨어 부분에서의 채널 높이는 마이크로비드의 직경보다 낮아야 한다. 이는 다층 구조의 마이크로채널 제작을 요구한다. 본 연구에서는 양성 PR의 spin-coating을 2회 반복하여 증착하였다. 결과적으로 양성 PR 박막의 두께 (추후에 마이크로채널 및 반응 챔버의 높이)는 앞의 실험에서 언급한 바와 같이 대략 24 μm 이었다. 웨어 부분의 채널 높이를 마이크로비드의 직경보다 낮게 하기 위해서는 양성 PR이 14 μm 이상 제거되어야 하며, 이를 위해서, 그림 3의 참조하여, 웨어 부분의 명암을 50%로 설정하여 마이크로채널의 패턴을 디자인하였다. 마이크로채널의 패턴은 잉크젯 프린터를 이용하여 출력하였으며, 카메라를 통해 10:1로 축소된 회색 명암 포토마스크를 제작하였다. 회색 명암 포토마스크를 이용하여 90 초의 노광 공정을 거쳤으며, 노광 공정 후 110초 동안의 현상 공정이 진행되었다.

제작된 주형을 틀로 하여 경화제와 혼합된 PDMS를 경화 시킴으로써 바이오칩의 채널 부분을 제작하였으며, 경화된 PDMS를 유리 기판 위에 고정시킴으로써 바이오칩을 완성하였다.

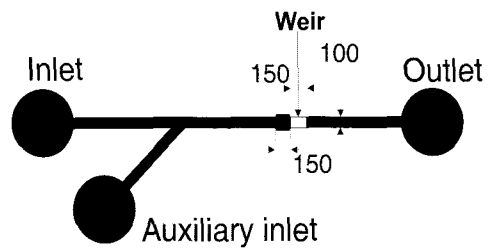


그림 5. 마이크로비드용 바이오칩의 패턴

Fig. 5. Layout of microbead-based biochip

그림 6(a)는 제작된 바이오칩의 반응 챔버의 영상을 보여 준다. 반응 챔버의 높이는 대략 24 μm 이었으며, 웨어 부분의 높이는 6.0μm±0.7로 측정되었다. 이러한 결과는 회색 명암과 현상 시간에 따른 PR의 제거 두께를 보여 주는 그림 3의 결과와 일치한다. 웨어의 높이가 반응 챔버에 비해 낮다는 것을 실질적으로 확인하기 위해 50nM의 fluorescein 용액을 마이크로채널에 채웠으며, 형광 현미경(Nikon Eclipse TE 300, Nikon Co., Japan)을 이용하여 그림 6(b)

와 같은 형광 영상을 얻었다. 위어 부분의 형광도가 낮음이 육안으로 관찰되었으며, 이는 그 부분의 높이가 낮음을 의미한다.

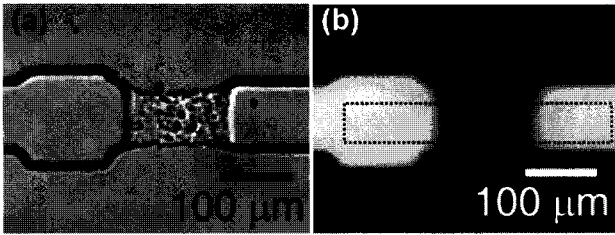


그림 6 제작된 바이오칩의 반응 챔버 영상  
(a) 반응 챔버의 광학 영상  
(b) 50nM의 fluorescein으로 채워진 반응 챔버의 형광 영상

Fig. 5. Micrograph of biochip  
(a) Optical micrograph of reaction chamber in biochip  
(b) Fluorescence image of reaction chamber filled with 50nM fluorescein solution

항체가 고정화된 마이크로비드를 이용하여 바이오칩에서의 항원-항체 반응 가능성을 확인하였다. 이를 위해서, 카르복실기를 가지고 있는 마이크로비드(지름 : 9.95 $\mu$ m)가 사용되었으며, 공유 결합법에 따라 항체인 anti-mouse IgG (Sigma Co., USA)가 코팅되었다[9]. 항체가 코팅된 마이크로비드를 반응 챔버에 채우기 위해 마이크로실린지를 이용하여 입구를 통해 마이크로비드를 주입하였다. 그림 7(a)는 마이크로비드가 채워진 반응 챔버의 영상을 보여 준다. 마이크로비드의 직경(9.95 $\mu$ m)이 위어의 높이(6.0 $\mu$ m)에 비해 높기 때문에, 출구 쪽으로 누출 없이 반응 챔버를 채울 수 있었다. 그림 7(a)를 관찰을 통해 마이크로비드는 2층 이상으로 반응 챔버에 채워진 것을 확인할 수 있으며, 이는 반응 챔버의 높이(24 $\mu$ m)가 마이크로비드의 직경보다 2배 이상 높기 때문에 사료된다. 항원-항체의 반응을 관찰하기 위해서, 형광 물질로써 fluorescein이 결합된 mouse IgG의 500nM 수용액이 채널 상에 주입되었다. 4배율의 렌즈가 이용되었으며, 실린지 펌프(Harvard Apparatus Co, USA)를 이용하여 항원 용액의 유속을 0.1 $\mu$ L/min으로 설정하였다. 반응 시간 동안의 항원 용액 주입에 따른 압력의 증가에도 마이크로비드의 누출은 발견되지 않았다. 그림 7(b)는 반응이 완료된 후의 반응 챔버 내의 형광 영상을 보여 준다. 항체가 고정화된 마이크로비드에 형광 물질이 부착된 항원이 결합함을 확인할 수 있다. 그림 7(c)는 항원-항체의 반응 시간에 따른 반응 챔버 내 (그림 7(a)의 사각형 영역)의 형광 강도의 변화를 보여준다. 반응 초기 5분 간에는 항원-항체 반응이 급속히 진행되었으며, 이후에는 점진적으로 형광이 증가하였다. 대략 20분 후에는 항원-항체 반응이 완료되는 것을 관찰하였다. 이러한 반응 시간은 전형적인 면역 반응 프로토콜(대략 2시간 이상)에 비해 매우 짧은 것으로, 미세유체 역학의 장점으로 사료된다[9].

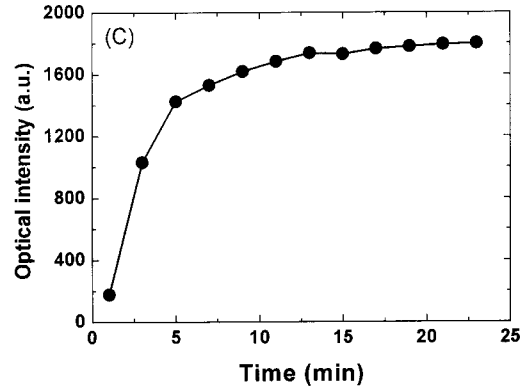
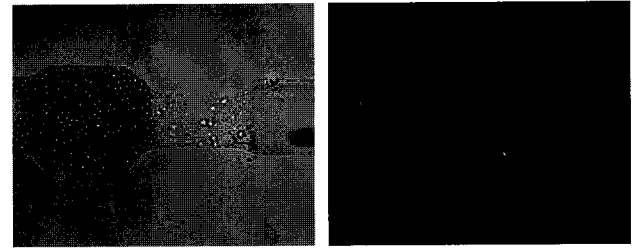


그림 7. 마이크로비드를 이용한 항원-항체 반응  
(a) 마이크로비드로 채워진 반응 챔버 광학 영상  
(b) 항원-항체 반응 후의 형광 영상  
(c) 반응 시간에 따른 형광 강도의 변화

Fig. 7. Antigen-antibody reaction using microbeads in biochip  
(a) Micrograph of reaction chamber packed with microbeads.  
(b) Fluorescence image after antigen-antibody reaction completed.  
(c) Change of optical intensity as a function of reaction time.

### 3. 결론

미세유체공학을 기반을 하는 바이오칩 기술은 의료 진단 및 U-healthcare 시스템 등 다양한 분야에서 적용될 수 있다. 이에 따라 바이오칩의 개발을 위한 연구 결과들이 발표되고 있으며, 다양한 기능을 수행하기 위한 바이오칩의 구조가 제시되고 있다. 이에 따라 바이오칩을 구성하는 각종 구성 요소가 복잡해지고 다층 구조의 마이크로채널도 요구되고 있다. 한 예로서, 시료를 혼합하기 위한 수동 혼합기의 다층 구조가 제안되기도 하였다. 본 연구에서는 다층 구조의 마이크로채널을 단순 공정을 통해 제작할 수 있는 gray-scale photolithography (GSPL) 공정을 보고하였다. GSPL을 위한 회색 명암 포토마스크를 제작하였으며, 명암 정도 및 현상 시간에 따라 다층 구조의 두께를 조절할 수 있음을 보였다. 또한, 회색 명암 포토마스크를 이용하여 마이크로비드를 채울 수 있는 바이오칩을 제작하였다. 마이크로비드가 채워지는 반응 챔버의 출구에 다층 구조의 위어를 형성하였다. 또한, GSPL 기법을 이용하여 제작된 바이오칩을 이용하여 항원-항체의 반응을 수행할 수 있음을 보였다. 결론적으로, GSPL은 바이오칩의 설계에 있어서 2층 이상

의 높이가 요구될 경우에 단순히 포토마스크의 명암을 변경함으로써, 간단히 다층 구조 또는 3차원 구조를 제작하는 데 활용될 수 있다. GSPL를 통해, 바이오칩 제조 공정의 단순화와 경비 절감 등이 가능할 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- [1] Bashir, R., "BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects", *Advanced drug delivery review*, vol. 56, pp. 1565-1586, 2004.
- [2] Fortina, P., Kricka, L.J., Surrey, S., Grodzinski, P., "Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition", *Trends in Biotechnology*, vol. 23, pp. 168-173, 2005.
- [3] E. Eteshola, D. Leckband, "Development and characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels", *Sensors and Actuators B*, 2001, vol. 72, pp.129-133.
- [4] Duffy, D.C., McDonald, J.C., Schueller, O.J., Whitesides, G.M., "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)", *Analytical chemistry*, vol. 70, pp. 4974-4984, 1998.
- [5] Wu, M.-H., Park, C., Whitesides, G.M., "Fabrication of arrays of microlens with controlled profiles using gray-scale microlens projection photolithography", *Langmuir*, vol. 18, pp. 9312-9318, 2003.
- [6] Chen, C., Hirdes, D., Folch, A., "Gray-scale photolithography using microfluidic photomasks" *Proceedings of national academic sciences*, vol. 100, pp. 1499-1504, 2003.
- [7] Seong, G.H., Crooks, R.M., "Efficient mixing and reactions within microfluidic channels using microbead-supported catalysts", *Journal of American chemical society*, vol. 124, pp. 13360-13361, 2003.
- [8] Sato, K., Tokeshi, M., Kimura, M., Kitamori, T., "Determination of carcinoembryonic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassay in a microchip for cancer diagnosis", *Analytical Chemistry*, vol. 73, pp. 1213-1218, 2001.
- [9] Bae, Y.M., Oh, B.-K., Lee, W., Lee, W.H., Choi, J.-W., "Immunosensor for detection of *Yersinia enterocolitica* based on imaging ellipsometry", *Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 1799-1803, 2004.

### 저 자 소 개



#### 배 영 민 (裴映玟)

1972년 2월 20일생. 1994년 서울대학교 농공학과 졸업. 2001년 동 대학원 농공학과 졸업(공학). 2006년~현재 한국전기연구원 선임연구원  
 Tel : 031-8040-4314  
 Fax : 031-8040-  
 E-mail : kimbym@keri.re.kr