

The Scattering Beam Measurement of the RBC and the Fabrication of the Micro Cell Biochip

In Soo Byun*[†], Ki Jin Kwon[‡], Joon Ha Lee*

*Department of Biomedical Engineering, Yeungnam University, [†]Department of Electrical & Electronic Engineering, Daegu Technical University, [‡]Department of Biomedical Engineering, Yeungnam College of Science & Technology, Daegu, Korea

Next future, The bio technology will be a rapidly developing. This paper is the scattering beam measurement of the red blood cell (RBC) and the fabrication of the micro cell biochip using the bio micro electro mechanical system (Bio-MEMS) process technology. The Major process method of Bio-MEMS technology was used the buffered oxide etchant (BOE), electro chemical discharge (ECD) and ultraviolet sensitive adhesives (UVSA). All experiments were the 10 times according to the process conditions. The experiment and research are required the ultraviolet expose, the micro fluid current, the cell control and the measurement of the output voltage V_{pp} (peak to peak) waveform by scattering angles. The transmitting and receiving of the laser beam was used the single mode optical fiber. The principles of the optical properties are as follows. The red blood cells were injected into the micro channel. The single mode optical fiber was inserting in the guide channel. The He-Ne laser beam was focusing in the single mode optical fiber. The transmission He-Ne laser beam is irradiating to the red blood cells. The manufactured guide channel consists of the four inputs and the four outputs. The red blood cell was allowed with the cylinder pump. The output voltage V_{pp} waveform of the scattering beam was measured with a photo detector. The receiving angle of the output optical fiber is 0° , 5° , 10° , 15° . The magnitude of the output voltage V_{pp} waveform was measured in the decrease according to increase of the reception angles. The difference of the output voltage V_{pp} waveform is due differences of the light transmittance of the red blood cells.

Key Words: Red blood cell (RBC), Bio micro electro mechanical system (Bio-MEMS), Buffered oxide etchant (BOE), Electro chemical discharge (ECD), Ultra violet sensitive adhesives (UVSA)

서 론

본 논문은 적혈구의 광학적 특성 분석과 마이크로 세포 분석 바이오칩 제작에 관한 논문이다. 바이오칩 제작은 Bio-MEMS 공정 기술로 제작하여 적혈구의 광학적 특성을 분석하였다. Bio-MEMS는 바이오와 멤즈의 합성어로서 체내외의 생체적인 신호를 분석할 수 있는 기술을 말하며 유전자 재조합과 세포분리 및 분석, 유전, 성장, 제어, 물질대사에 적용하는 바이오칩 기술로서 소형 및 휴대용으로 제작시 언제 어디서나 진단하여 치료가 가능한 융합기술 분

야이다.¹⁾ Bio-MEMS 공정 기술을 이용하여 글라스 패턴 에칭을 위한 포토리소그래피(photo lithography)와 산화원충식각(BOE: buffered oxide etchant),²⁾ 광섬유 글래딩 에칭을 위한 산화원충식각,³⁾ 글라스 홀을 위한 전기화학방전(ECD: electro chemical discharge),⁴⁾ 글라스 접합을 위한 자외선반응접합(UVSA: ultraviolet sensitive adhesives)⁵⁾ 공정으로 제작하였으며 이를 이용하여 유체와 세포의 흐름 제어를 위한 라미나 흐름 조절^{6,7)}과 적혈구에 대한 광학적 산란법 파형^{8,9)} 측정이 가능하다.

Bio-MEMS 공정 기술로 제작한 마이크로 세포 바이오칩은 바이오칩 채널내의 감지 포인트에서 각도에 따른 산란법을 출력전압 파형으로 간단하게 측정하였다. 이로 인하여 바이오칩 제작 공정 기술과 세포 분석 기술의 활성화가 기대된다.

Received 9 May 2014, Revised 26 May 2014, Accepted 2 June 2014

Correspondence: Joon Ha Lee (jhrhee@ynu.ac.kr)

Tel: 82-53-620-3006, Fax: 82-53-629-1344

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

1. 마스크 제작

마이크로 세포 분석 바이오칩의 세부 패턴을 제작하기 위하여 오토캐드(auto cad) 프로그램을 이용하여 설계하였다. 바이오칩의 마스크(mask) 패턴을 소프트 마스크인 필름 마스크로 제작하였다.

Fig. 1은 적혈구의 이동 제어와 적혈구에서 나온 산란빔을 각도에 따라 광학적 특성을 분석할 수 있도록 설계하였다. Fig. 1(A)는 같이 적혈구의 주입구 채널, Fig. 1(B)는 같이 적혈구의 흐름을 정렬하기 위한 버퍼의 주입구 채널, Fig. 1(C)는 적혈구의 정렬 이동로 채널, Fig. 1(D)는 싱글모드 광섬유를 사용하여 레이저 빔을 적혈구에 조사하고 0°, 5°, 10°, 15° 각도에 따른 산란빔 측정을 위한 광섬유 가이드 채널, Fig. 1(E)는 적혈구의 폐기를 위한 출구 채널로 마

스크 패턴을 설계하였다.

2. 글라스 에칭

글라스 에칭은 Bio-MEMS 공정의 포토리소그래피와 산화환충식각 방법으로 에칭하였다. 포토리소그래피 방법은 특정한 감광액(PR: Photoresist)에 마스크 패턴을 사용하여 자외선(UV: ultraviolet)을 선택적으로 노광함으로써 마스크 패턴과 동일한 형상으로 제작되는 것이다. 감광액은 포지티브(positive)를 사용하였다.

Fig. 2는 버퍼액을 사용하여 적혈구를 일렬로 정렬할 수 있는 부분을 주사전자현미경(SEM: scanning electron microscope)으로 촬영한 확대 사진이며 감광액의 두께는 10 μm 이고 폭은 100 μm이다. 제작 공정 조건으로 글라스에 깊이 50 μm, 폭 100 μm의 에칭을 하기 위하여 산화환충식각 용액 NH₄F : HF 비율을 6 : 1로 하고 울트라소닉 배스(UAB: ultrasonic agitation bath)내의 온도를 90°C로 유지하

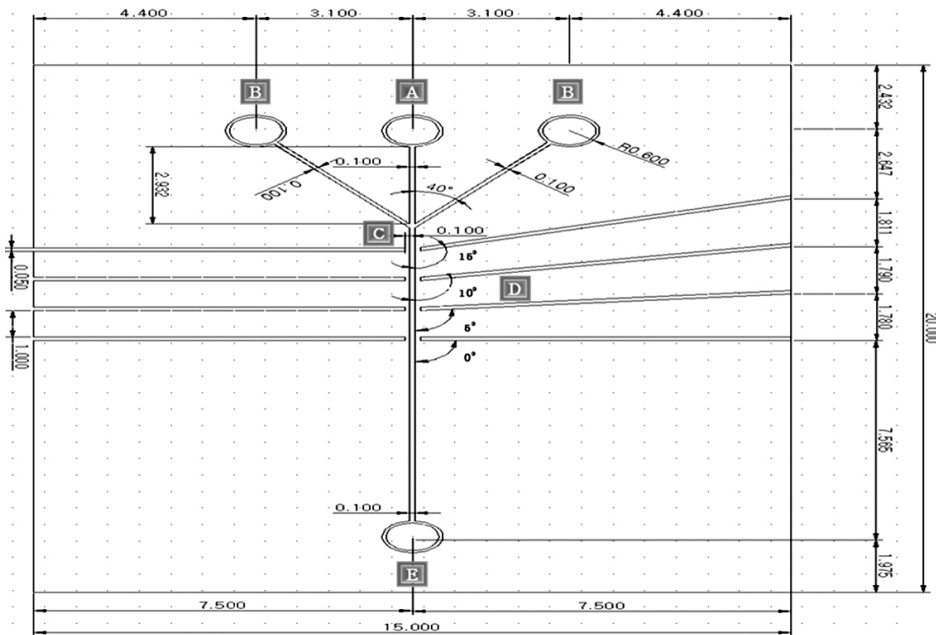


Fig. 1. Mask pattern by auto CAD program.

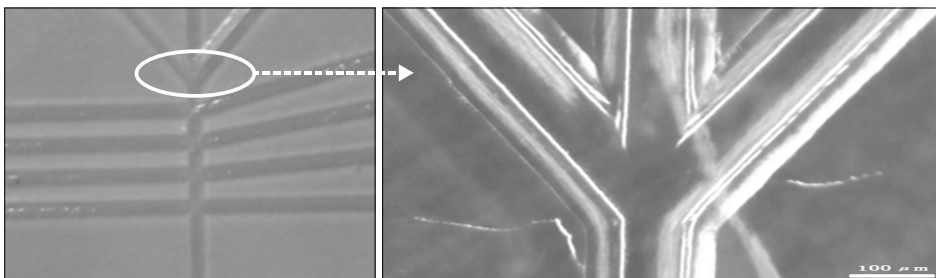


Fig. 2. Channel pattern for red blood cells focusing.

고 39분 동안 글라스 미세 채널들을 안정적으로 에칭하였다.

3. 광섬유 클래딩 에칭

광섬유 클래딩(cladding) 에칭은 산화환충식각 방법으로 에칭하였다.

Fig. 3은 광섬유 클래딩 에칭 부분을 주사전자현미경으로 촬영한 확대 사진이다. 제작 공정 조건으로 싱글 모드 광섬유(single mode optical fiber)의 클래딩 지름이 70 μm 로 에칭하기 위하여 산화환충식각 혼합액 $\text{NH}_4\text{F} : \text{HF}$ 비율을 6 : 1과 울트라소닉 베스내의 고정 온도를 90°C로 유지하고 9분 동안 안정적으로 에칭하였다.

4. 글라스 홀

글라스 미세 홀(hole) 가공은 전해 가공과 방전 가공 방법을 혼합한 전기화학방전 방법으로 가공하였다.¹⁰⁾ 혼합액인 NaOH와 H_2O_2 에 니들(needle)과 백금(Pt) 전극을 담그고 니들에 음극(cathode), 백금에 양극(anode)을 연결한다. 전압은 직류(direct current, DC) 전압을 인가하여 가공하였다. 니들은 일본의 오리온(orion corporation) 회사에서 생산한 니

들(steel, 0.25 mm)을 사용하였다.

Fig. 4는 니들 끝부분이 용액에 접촉하면서 방전 불꽃이 발생하는 사진이 나타나있다. 제작 공정 조건으로 글라스 홀 지름이 600 μm 인 홀 가공을 위하여 NaOH (35w%)와 H_2O_2 의 비율을 1 : 1로 혼합하고 직류 전압을 35 V로 인가하여 안정적으로 에칭하였다.

Fig. 5는 제작한 글라스 홀 부분을 주사전자현미경으로 촬영한 확대 사진이다.

5. 글라스 접합

제작한 패턴 글라스와 커버 글라스는 자외선 반응접합 방법을 이용하여 접합하였다. 자외선 반응접합 원리는 접합액에 자외선을 노광하면 접합액의 화학적인 변화에 의하여 경화되는 원리이다.

Fig. 6은 접합액을 사용하여 접합한 광섬유를 고정할 수 있는 가이드 채널 부분을 주사전자현미경으로 확대 촬영한 사진이다. 채널의 길이 50 μm , 폭 50 μm , 가이드 채널간의 간격은 100 μm 이다. 제작 공정 조건으로 접합액을 10 μm 두께로 코팅한 커버 글라스와 패턴 글라스를 정렬시켜

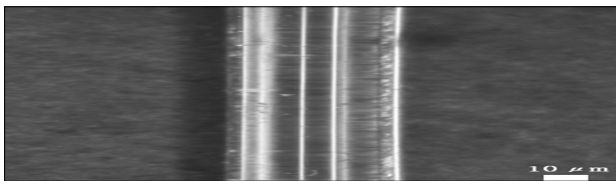


Fig. 3. Diameter etching of optical fiber cladding.

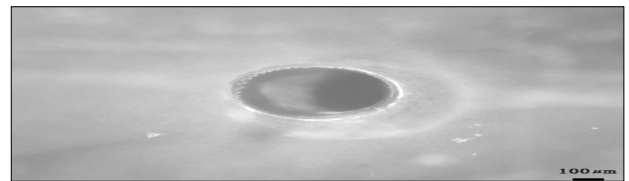


Fig. 5. Roughness condition of glass hole etching.



Fig. 4. Spark discharge of needle end point in solution.

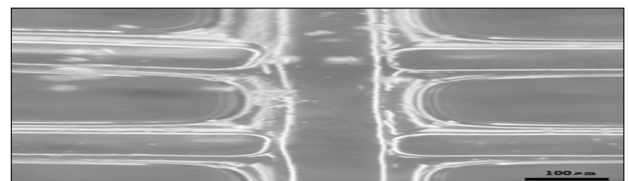


Fig. 6. Bonding of optical fiber guide channel.

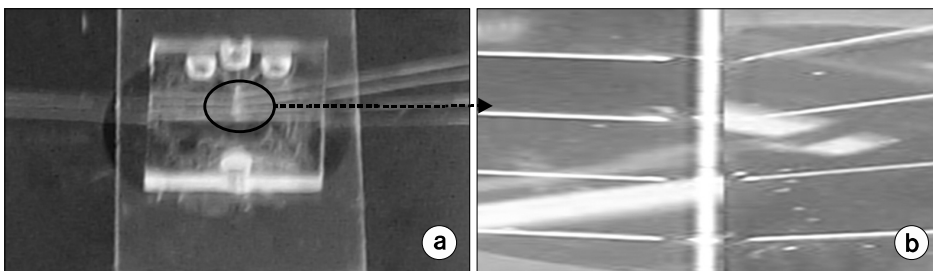


Fig. 7. Completed biochip (a) and laser beam in optical fiber (b).

자외선을 10초 동안 노광하여 안정적으로 접합한다. 자외선은 파장이 365 nm, 정격전력이 20 mW/cm²을 사용하였다.

6. 적혈구 실험

Fig. 7(a)은 제작한 마이크로 세포 분석 바이오칩을 사용하여 적혈구에 대한 산란빔 특성 실험을 하였다. 칩의 전체 크기는 가로 15 mm, 세로 20 mm이며 광원으로는 헬륨 네온 레이저(658 nm, 9.88 mW)를 사용하였다. Fig. 7(b)는 레이저 빔을 싱글 모드 광섬유에 조사한 부분을 촬영한 사진이다. 출력측의 광섬유 각도를 0°, 5°, 10°, 15°로 제작하여 각도에 따른 산란빔의 전압 크기를 측정하였다.¹¹⁾ 싱글모드 광섬유는 전체 지름이 50 μm, 코어 지름이 9 μm 이다.

Fig. 8은 중앙 채널의 유체 흐름을 가장자리 채널보다 주입 속도를 빠르게하여 중앙 채널에 가늘게 유체 흐름을 만들고 중앙 채널에 적혈구를 주입하여 레이저 빔이 조사되는 감지 포인트와 배출부분까지 이동하게 된다. 포커싱 조건은 실리지 펌프(syringe pump)를 사용하여 중앙의 채널에 유체를 1 μl/min, 가장자리 채널에는 2.5 μl/min로 주입하여 유체의 흐름을 정렬하였다.¹²⁾

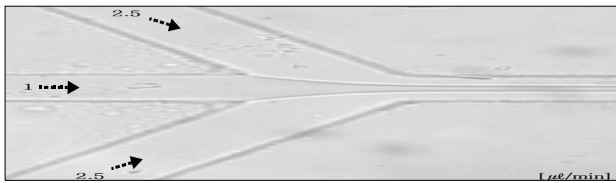


Fig. 8. Sheath current of cell focusing channel.

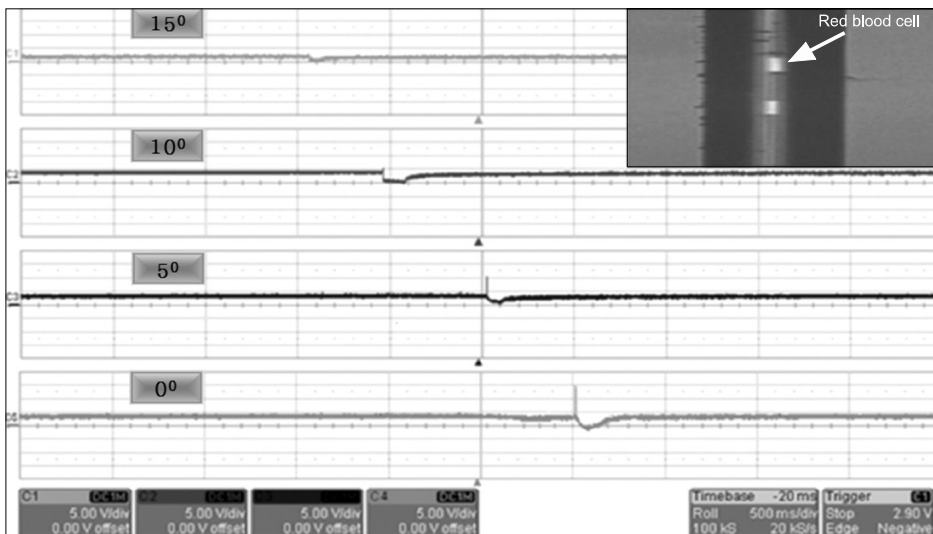


Fig. 9. Voltage output wave of red blood cells by angles.

Fig. 9는 싱글 모드 광섬유를 통과한 레이저 빔이 감지 포인트에서 적혈구를 조사하고 적혈구에 나온 산란빔을 포토다이오드 센서로 감지하게 된다. 오실로스코프(lecroy/wave runner)를 사용하여 출력 전압 Vpp (peak to peak voltage) 파형을 측정하였다.¹³⁾ 측정된 전압 크기는 출력측의 광섬유 각도가 0°일 때 전압이 약 17 V, 각도가 5°일 때 전압이 약 10 V, 각도가 10°일 때 전압이 약 6 V, 각도가 15°일 때 전압이 약 4 V로 측정되었다.¹⁴⁾

결 과

본 논문은 Bio-MEMS 공정 기술을 이용하여 마이크로 세포 분석 바이오칩을 제작하였으며 이를 사용하여 적혈구의 광학적 전압을 측정하였다. 글라스와 싱글 모드 광섬유 글래딩의 안정적 에칭 조건은 산화환원식각 방법을 이용하여 NH₄F : HF의 비율을 6 : 1, 울트라소닉 배스내의 온도를 90°C에서 제작하였다. 글라스 홀의 안정적 에칭 조건은 전기화학방전 방법을 이용하여 NaOH(35w%) : H₂O₂의 비율을 1 : 1, 직류 전압 35 V로 인가하여 제작하였다. 패턴 글라스와 커버 글라스 접합의 안정적 에칭 조건은 자외선 반응접합 방법을 이용하여 접합액 코팅 두께 10 μm에 자외선(365 nm, 20 mW/cm²)을 10초 동안 단시간 접합액에 노출시켜 접합하였다. 제작한 마이크로 세포 분석 바이오칩을 사용하여 적혈구의 산란빔 전압을 측정하여 적혈구의 특성을 분석하였다. 출력측 광섬유 각도가 0°일 때 전압이 약 17 V, 각도가 5°일 때 전압이 약 10 V, 각도가 10°일 때 전압이 약 6 V, 각도가 15°일 때 전압이 약 4 V로 측정되었

다. 측정된 전압 크기는 광섬유 각도가 커질수록 산란빔의 세기가 작게 측정되었다. 이는 적혈구 내부의 레이저빔 투과율과 반사율 차이로 각도가 커질수록 광섬유로 감지되는 산란빔의 양이 적어 전압이 작게 측정된다.

고찰 및 결론

본 실험으로 제작에 요구되는 재료들의 Bio-MEMS 공정 기술을 이용하여 안정적으로 제작하였다. 제작한 마이크로 세포 바이오칩을 사용하여 출력 광섬유의 각도에 따라서 적혈구의 산란빔 차이를 확인하였으며 광섬유의 각도에 따른 출력전압 파형을 측정하였다. 또한 측정된 출력 전압 크기 비교에서 광섬유 각도가 커질수록 산란빔의 세기가 작게 측정된 것은 적혈구 내부의 레이저빔 투과율과 반사율 차이로 각도가 커질수록 광섬유로 감지되는 산란빔의 양이 적어 출력 전압이 작게 측정된다. 이는 사용자가 원하는 세포나 입자의 광학적 현상을 전압으로 측정이 가능하고 기존의 세포 바이오칩보다 소형화, 단순화 하였고 적혈구의 광학적 산란빔을 확인하였다. 따라서 Bio-MEMS 기술을 향상시킴과 동시에 의공학(biomedical engineering), 반도체공학(semiconductor engineering), 생물정보학(bioinformatics), 바이오칩 공학(biochip engineering) 등의 응용과학 분야 활성화 발전에 기여할 것으로 기대한다.

References

1. **The Korean Federation of Science and Technology Societies.** 2020 year bio economic opening. Science and technology 375:42-45, 1599-7340 (2000)
2. **Jing XM, Chen D, Fang DM, Huang C, Liu JQ:** Multilayer microstructure fabrication by combining bulk silicon micromachining and UV-LIGA technology. Microelectronics J 38:120-124 (2007)
3. **Bu MI, T Melvin, GJ Ensell:** A new masking technology for deep glass etching and its microfluidic application. Sensors and Actuators A 115:476-482 (2004)
4. **Hu CY, Lo SL, Li CM, Kuan WH:** Treating chemical mechanical polishing (CMP) wastewater by electro coagulation flocculation process with surfactant. J Hazardous Mater 120:15-20 (2005)
5. **정안목, 전의식, 김철호:** A study on the metal-glass bonding using ultra-sonic. J the Semiconductor & Display Technology 10(2):June (2011)
6. **Zbigniew D, Paul R, Harry C:** Flow cytometry. Academic press (2nd):part A-B (1995)
7. **David PS, Christopher TC, Stephen CJ, Michael R:** Microchip flow cytometry using electro kinetic focusing. Analytical Chemistry 71(19):4173-4177 (1999)
8. **Kim S, Williams RT, Lee HK, Midori M:** Turner size characterization of magnetic cell sorting micro beads using flow field flow fractionation and photon correlation spectroscopy. J Magnetism and Magnetic Materials 194:248-253 (1999)
9. **Daniel S, Young AM, Gray ML, Senturia SD:** A micro fabricated flow chamber for optical measurements in fluids. IEEE: 219-224 (1993)
10. **Yoo DS, Sim KS:** Track distribution of recoil protons in PN-3 dosimeters etched in NaOH solution. Korean Society of Medical Physics 2(2):129-139 (1991)
11. **Lee BY, Yoon HG, Hyun KS, Kwon YH, Yun IG:** Investigation of manufacturing variations of planar InP/InGaAs avalanche photodiodes for optical receivers. Microelectronics J 35:635-640 (2004)
12. **Al-Mufti R, Hambley H, Albaiges G, Lees C, Nicolaidis KH:** Increased fetal erythroblast in women who subsequently develop preeclampsia. Hum Reprod 15:1624-1628 (2000)
13. **신동오, 홍성연, 이병용, 이명자:** The construction of solid state detector system using commercially available diode and its application. Korean Society of Medical Physics 1(1):91-95 (1990)
14. **Jian J, Lili C, Chengrong S, Fu XZ:** A study of the effect of PTFE electret on fibroblast cell cycle with flow cytometry (FCM). Proceedings of 10th International Symposium on Electrets:171-173 (1999)

적혈구의 산란빔 측정과 마이크로 세포 분석 바이오칩 제작

*영남대학교 의공학과, †대구공업대학교 전기전자계열, ‡영남이공대학 의료기기과

변인수*[†] · 권기진[‡] · 이준하*

본 논문은 Bio-MEMS 공정으로 제작한 마이크로 세포 분석 바이오칩을 사용하여 적혈구의 광학적 특성을 전압으로 측정하는 실험이다. Bio-MEMS 공정을 이용하여 세포의 원활한 이동과 측정 분석에 사용되는 글라스에 채널 패턴 에칭을 위하여 포토리소그래피(photolithography)와 산화완충식각(BOE: buffered oxide etchant) 공정 조건, 세포 분석과 정보 전달에 사용되는 광섬유의 에칭을 위하여 산화완충식각 공정 조건, 세포나 유체를 칩과 외부의 전달 등에 사용되는 글라스의 홀을 위하여 전기화학방전(ECD: electro chemical discharge) 공정 조건, 글라스 접합을 위한 자외선반응접합(UVSA: ultraviolet sensitive adhesives) 공정 조건을 정립하였다. 또한 유체나 세포의 흐름 제어를 위한 라미나 흐름 조건, 적혈구 세포에 대한 산란빔 파형을 측정하였다. 적혈구 실험을 통하여 출력 광섬유의 각도에 따른 산란빔이 출력측의 광섬유 각도가 0°일 때 약 17 V, 각도가 5°일 때 약 10 V, 각도가 10°일 때 약 6 V, 각도가 15°일 때 약 4 V의 전압(Vpp)으로 측정되었다. 따라서 마이크로 세포 분석 바이오칩 제작의 소형화, 단순화, 공정시간 단축, 정량화하였고 적혈구의 광학적 특성을 측정을 측정함으로써 의공학(biomedical), 바이오칩공학(biochip), 반도체공학(semiconductor), 생물정보학(bioinformatics) 등의 응용과학 분야 발전에 기여할 것으로 기대한다.

중심단어: 적혈구(RBC), Bio-MEMS, 산화완충식각(BOE), 전기화학방전(ECD), 자외선반응접합(UVSA)