

98-NQ-06-01-A

GOVP 19917104

국책연구개발사업 스타프로젝트
Star Project

BIOCHIP 기술연구
Development of Biochip Technology

한 국 과 학 기 술 원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 국책 연구 개발 사업 스타 프로젝트 “바이오칩 기술 연구”과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1999. 5.

주관연구기관명 : KAIST 의과학연구소
주관연구책임자 : 유 옥 준
(의과학연구소 소장)
연 구 원 : 김 학 성
(생물과학과 교수)
“ : 곽 주 현
(화학과 교수)
“ : 이 영 훈
(화학과 교수)
“ : 조 영 호
(기계공학과 교수)
“ : 이 수 영
(전기·전자공학과 교수)
“ : 한 철 희
(전기·전자공학과 교수)
“ : 이 상 엽
(화학공학과 교수)

여 백

요 약 문

I. 제 목

바이오칩 기술 연구 (Development of Biochip Technology)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

의료·연구 및 정보전자 분야의 바이오칩을 개발하여 국민 보건 의료 수준의 향상과 산업 발전을 도모하고 전문 분야간의 융합으로 첨단 신규 학문의 창출 및 새로운 산업으로서의 도약을 선도하는 발전적인 모델을 제시하는 동시에 반도체 소자를 대체할 수 있는 고성능·소형의 바이오칩 구현을 위한 생물전자 소자의 기반 기술을 확립함.

2. 연구개발의 필요성

- 바이오칩이란 생체분자(효소, 핵산, 단백질 등)의 작용 메커니즘과 첨단 공학 기술(전자공학, 광학, 기계공학 등)을 함께 이용하여 여러 가지 유용한 정보나 신호를 분석 처리하는 고도의 시스템을 말하며, 최근 미세 가공 기술이 첨가되면서 더욱 소형화, 고성능화 하고 있음.
- 바이오칩은 유전자의 발현 및 변이/다형 분석, 질환 관련 인자들의 정밀 측정, 물리 화학적 요인의 측정 등 다양한 분야에 활용되고 있으며 산업적 수요 뿐 아니라 질환 진단을 위한 의료계의 잠재수요도 대단히 큼.
- 바이오칩은 다학제간 융합을 통해서만 연구개발이 가능한 대표적인 분야로 본 연구를 통해 국내 관련 학계의 협조체계 구축 및 연구 수준을 향상시키고 이제 시장 형성 단계에 이른 바이오칩 산업을 선도할 위치에 오르는 것이 시급함.
- 바이오칩에는 물리적 요인이나 화학 생리적 물질의 측정을 위한 바이오센서, 유전자 발현 및 다형 분석을 위한 유전자 칩 (DNA chip), 미세 가공 기술을 이용한 구조체 및 생물학적 유체 이송 시스템, 신경 세포의 정보 처리 방식을 적용한 신경 회로망 칩 등이 있음.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. DNA microarray chip 시스템의 개발 (의과학연구센터 유욱준)

2. LDH, AST, 및 glucose 측정용 전기화학식 후막형 멀티 바이오센서의 개발 (생물과학과 김학성)
3. 자기조립 생체분자의 전기화학적 특성 연구 (화학과 곽주현)
4. 생화학적 diode 소자 재료의 합성 (화학과 이영훈)
5. 미소영역에서의 극미량 bio-object의 이송을 위한 기본요소 및 미소현상 연구 (기계공학과 조영호)
6. 다중 센서 신호 처리에 관한 연구 (전기 및 전자공학과 이수영)
7. Multi-biosensor를 위한 미세 구조 연구 (전기 및 전자공학과 한철희)
8. Gene expression monitoring을 위한 실험방법의 확립 및 DNA chip 제작 (화학공학과 이상엽)

IV. 연구개발결과

1. DNA microarray chip 시스템의 개발
 - 가. 정밀 직교 3축 로봇과 4개의 micro-spotting pin을 이용한 DNA microarrayer 및 구동 소프트웨어를 제작하였으며 중심간 간격이 0.2 mm 이하인 고밀도의 microarray를 인쇄할 수 있음을 확인.
 - 나. DNA microarrayer를 이용한 효율적인 spotting 조건 확립.
 - 다. DNA chip의 형광 영상을 판독하는 단일 채널 형태의 laser scanning microarray chip reader를 설계 제작하고 multiplex analysis를 위해 제 2의 광원을 장착할 수 있는 기본 설계 완료.
 - 라. DNA chip reader의 작동 및 결과 영상 분석용 프로그램의 작성.
2. LDH, AST, 및 glucose 측정용 전기화학식 후막형 멀티 바이오센서의 개발
 - 가. 후막기술(thick-film technology)을 이용한 바이오센서의 제작기술 확립
 - (1) 삼전극계(three electrode system)를 적용한 바이오센서의 제작
 - (2) Working electrode는 conducting material인 graphite와 효소의 기질 및 조효소, 그리고 이들을 효과적으로 포집할 수 있는 composite polymer와 electron transfer mediator 등으로 구성됨.
 - 나. NADH에 대한 electron transfer mediator로 채용된 3,4-dihydroxy benzaldehyde의 working electrode 내에서의 전기화학적 특성 조사
 - (1) Potential cycling을 통한 thick-film electrode 내에서의 3,4-dihydroxy benzaldehyde의 electrodeposition 확인.
 - (2) 고정화된 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 효소반응 결과 생성된 NADH의 electrochemical oxidation에 있어 효과적인 electron transfer mediator임이 입증됨.
 - 다. 제작된 LDH 바이오센서의 LDH에 대한 calibration은 약 60 U/L 정도까지의 detection limit를 나타내었으며, 약 600 U/L의 LDH level까지의 직선 관계가 관찰됨.
3. 자기조립 생체분자의 전기화학적 특성 연구
 - 가. 생체 분자를 함유하는 두 가지 functionalized alkanethiol/Au system의 전자 전달 반응을 주사 전압전류법으로 연구.

- L-cysteine/Au에 cytochrome c (cyto.c) 와 pyrroloquinolinequinone (PQQ)가 각각 공유결합과 정전기적 결합을 하고 있으며 전압전류법 상으로 전극과 cyto. c 및 PQQ 간에 병렬 전자전달 경로가 있음을 확인함.
 - cyto. c가 mercaptopropionic acid (MPA)에 공유결합을 하고 있으며 용액 중 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 존재 하에 전극 표면에 고정되어 있는 cyto. c가 전극에서 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 으로 전자 전달 반응을 증대함을 확인.
 - MPA/Au(111) 및 cyto. c/MPA/Au(111)의 morphology를 STM으로 연구
- 나. 제작된 극미세전극의 전압 전류 특성 연구: 상용 미세전극(non-array)과 거의 같은 전압전류특성을 재현성 있게 나타내었으며 ppb 수준의 중금속 농도를 감지할 수 있는 높은 감도를 가짐을 확인함.

4. 생화학적 소자 재료의 합성

- 가. Self-assembled monolayer방법을 이용하기 위하여 세 가지 종류의 carboxylate terminated thiol을 합성.
- 나. 대표적인 전자 전달 단백질 중의 하나인 mouse와 *Bacillus*의 ferredoxin을 박테리아 내에서 재조합 형태로 다량 합성 정제하고 특성 조사.
- 다. 재조합 단백질들을 전극 위에 고정화시키기 위하여 재조합 단백질과 Ni^{2+} 이온을 사이에 두고 결합할 수 있는 nitrilotriacetic (NTA) group을 말단에 가지고 있는 thiol을 합성.
- 라. Bovine brain의 cytochrome b5와 *E. coli*의 bacterioferritin 유전자를 클로닝하고 재조합 fusion 단백질 형태로 분리 정제한 뒤 특성 조사.

5. 미소영역에서의 극미량 bio-object의 이송을 위한 기본 요소 및 미소 현상 연구

- 가. 극미량 혈액의 표면장력, 밀도 등 기초 물성 측정 및 분석자료 확보.
- 나. 미소 채널 및 미소 디퓨저 등 기본요소의 설계, 제작 및 시험.
- 다. 극미량 bio-object의 이송을 위한 구동원리 및 미소 박막재료 물성 측정.
- 라. 극미량 bio-object의 이송을 위한 micro-pump의 설계, 제작 및 시험.
- 마. 극미량 bio-object의 유동 제어를 위한 micro-diffuser valve 및 유동연구.
- 바. 미소 기본요소 제작을 위한 micromachining 공정 개발.

6. 다중 센서 신호 처리에 관한 연구

- 가. 시냅스와 뉴런으로 이루어진 신경회로망 칩을 이용해 간단한 패턴인식 문제를 풀 수 있는 시스템을 개발.
- 나. 벤치마크 자료를 이용한 시뮬레이션 .

7. Multi-biosensor를 위한 미세 구조 연구

- 가. 혈액의 이동을 위한 마이크로 채널 형성을 위한 실리콘 기판을 전기화학적 방법으로 식각하여 채널을 형성하는 연구 수행.
- 나. 마이크로 채널 형성을 위한 또 다른 방법으로 새로운 마이크로 삼차원 구조물 형성기술 제안.
- 다. 기존의 반도체 공정인 금속 증착 방법과 사진현상공정, liftoff 공정을 통

하여 미세 전극을 형성.

라. 전기중합방법을 이용한 효소의 부착 및 multi 전극 형성에 응용하기 위한 개선 방법과 새로운 효소 부착 방법 연구.

8. Gene expression monitoring을 위한 실험방법의 확립 및 DNA chip 제작

가. mRNA의 분리, 형광 표지, hybridization 조건 등 gene expression monitoring을 위한 실험 조건 확립.

나. PCR을 위한 프라이머 설계 프로그램의 제작.

다. Spotting 방식의 DNA microarrayer 제작.

라. 대장균의 heat shock response를 모델로 한 유전자 발현 패턴 연구.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 실용성 있는 유전자 진단/연구용 DNA microarray chip 소재 개발 및 관련 장비의 상품화.
2. AST, LDH 및 포도당의 혈중 농도를 동시에 측정 가능한 멀티 바이오센서의 개발.
3. 다양한 생체분자를 이용한 직렬 및 병렬 전자 전달 경로의 자기조립 단분자층을 개발하고 극미세전극 상에 이러한 생체분자로 이루어진 회로를 구성하여 biochip으로 응용가능성을 연구하는데 활용.
4. 여러 종류의 long-chain thiol이 금 전극 위에서 자기조립하는 특성을 이용하여 새로운 소자재료로 선택된 전자 전달 단백질들의 전기 화학적 특징을 얻어낼 수 있으며 본 연구를 통하여 합성한 전자 전달 단백질들의 제조 기술과 이들의 생화학적 특성은 새로운 소자재료 개발에 기본 자료로 사용.
5. 극미량 bio-object의 이송을 위한 기본요소의 결합 및 미소 복합현상 분석하고 극미량 시약 공급을 위한 micro-doser 혹은 micro-dispenser 개발하여 미소 DNA 증식기 및 미소 유전자 분석기 개발에 응용.
6. 아날로그 신경회로망의 단점을 보완하여 각종 음성인식이나 영상처리 등에 활용.
7. 반도체 제조공정을 응용하여 제조 비용의 극소화를 통해 개발한 일회용 검사 카트리지의 사용으로 손쉽고, 값싸게 질병 검사가 가능하게 되므로 기존에 판매되고 있는 글루코메타 시장에 진입할 수 있음.

S U M M A R Y

Biochip technology is a newly introduced field which can be described as a information and signal processing and/or measuring system utilizing biological principles with modern engineering techniques such as electronics, photonics, micromachining, etc. Classical electrode-based biosensors measuring physical factors, chemical/biological substances are being improved by the application of microfabrication processes, and the advent of DNA chip technology allowed us to investigate genetic informations related to human diseases and differential gene expression pattern on a genome-wide scale. Since industrial and medical demands for biochips have increased dramatically nowadays, we should make advances in developing the biochip technology by the cooperation of basic research and engineering field. Major goals of this study can be itemized as follows:

1. Development of DNA microarray chip manufacturing and reading system.
2. Development of thick-film type electrochemical biosensor measuring multiple substances in biological fluids.
3. Characterization of the electrochemical properties of self-assembly biomolecules.
4. Development of electroactive biomolecules for biological switching devices (diodes).
5. Investigation of microfluidic components and the associated microtransport phenomena.
6. Research on multiple sensor signal processing.
7. Fabrication of microstructure and microelectrode array for electrochemical multi-biosensor.
8. Development of experimental procedures for global gene expression monitoring and DNA microarray system.

1. A microarray spotting machine equipped with four spring-loaded quill-type printing pins and precision three-axis motion robot was developed. This system can automatically prints arrays of biological samples loaded from a multi-well plate on ~120 microscopic slides at a density of more than 2500 spots/cm². Selection of genes for diagnostic use and optimization of DNA immobilization chemistry is currently under progress. A laser-scanning system to read the chip data was also developed. An air-cooled argon ion laser was used for excitation of fluorescein as a major labeling dye, and a stepping motor-driven stage scanning system was adopted. This instrument scans 18 x 18 mm area within 5 minutes at a high resolution of 18 μ m resolution. To obtain fluorescence signal simultaneously from two fluorescent dyes for multiplex analysis, secondary laser source and improved optical filter system will be included.

2. A screen-printed biosensor based on amperometric determination of lactate dehydrogenase(LDH) level in biological fluid has been investigated. The printing ink used for the fabrication of screen-printed carbon electrode where enzyme-catalyzed reaction takes place is composed of lactate and NAD^+ , as substrate and cofactor, and graphite particle as conducting material. The printing-step is followed by modification with 3,4-dihydroxybenzaldehyde as an electron transferring mediator for enzymatically generated NADH by potential cycling. Voltammetric studies were carried out on both the electropolymerization of 3,4-dihydroxybenzaldehyde and the electrochemical oxidation of NADH. The results indicate that electrode fouling due to direct electrochemical oxidation of NADH can be bypassed through this approach. The detection limit of LDH level is 50 U/L, and the calibration curve is linear up to 600 U/L.
3. Electron transfer (ET) reactions in two functionalized alkanethiol/Au systems with biomolecules are studied with cyclic voltammetry (CV). In the first case, cytochrome c (cyto.c) and pyrroloquinolinequinone (PQQ) are attached to L-cysteine/Au covalently and electrostatically, respectively. CV shows that there are two parallel ET pathways from electrode to cyto. c and to PQQ. In the other case, cyto. c is covalently bound to mercaptopropionic acid (MPA). In the presence of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ on the solution side, it was shown that surface-bound cyto. c mediates ET from electrode to $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, while ET in reverse direction does not occur. This one-directional ET reaction is attributed to lower formal potential E^0 of cyto. c than that of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Finally, scanning tunneling microscopy (STM) morphology study of MPA/Au(111) and cyto. c/MPA/Au(111) shows that the surface is composed of a large number of pits of size \sim ca. 10 nm, as expected for general alkanethiol/Au system.
4. For biochip technology it is very important to develop biomolecules which can be used individually as electroactive species. The attachment of biomolecules onto a solid support is essential for the development of various advanced biosensors, bioreactors, and biological switching devices (diodes). In this study, electron transferring proteins with their specific redox potentials *in vivo* were immobilized on the metal surface modified by self-assembled monolayers (SAMs). For these protein layers, some electron transferring proteins were overexpressed in *E. coli* and thiols having varied functional groups were synthesized as promoters for SAMs. Using these electron transferring proteins and promoters, their electrochemical behaviors were investigated on the SAM gold electrode. The electrochemical properties of the electron transferring proteins on the SAM gold electrode can be used to develop biological diodes.
5. A set of microfluidic components and the associated microtransport phenomena have been investigated for applications to micro bio-object analysis chips. Fundamental microfluidic components, including micro-channels, micro-diffuser

valves and micro-pumps, have been designed, fabricated and tested for micro bio-object transport. A set of microactuators, based on the thermopneumatic, electromagnetic and piezoelectric principles, has been analyzed and tested as microflow generators. In addition, microfluidic behaviors and micromaterial properties have been measured and used for the micro-component design as well as for understanding physical phenomena in the micro regime. The microcomponents and the associated experimental data and results obtained in the present research can be applied to the development of a wide spectrum of micro biomedical devices and equipments, such as micro-dosers, micro-dispensers, micro total analysis systems, and micro DNA amplification and analysis systems.

6. The purpose of this sub-project is to research of the multi-sensor signal processing. The material in blood is sensed by bio-sensors. And the outputs of the sensors are transformed into electrical signals. A classifier should make a diagnosis of the signals. We should design the classifier using silicon ASIC technology. We developed the pattern classifier using analog neural network chips. And we test the system with XOR-problem and Wine-problem in the bench mark data.
7. We have fabricated microstructure and micro electrode array for electrochemical multi-biosensor. Microelectrode arrays have been fabricated for the measurement of protein and glucose in blood using semiconductor technologies that liftoff process, metal thermal evaporation, photolithography, and PECVD. We have investigated the method of immobilization of enzyme. The electroconductive polypyrrole film was prepared by the electropolymerization of the corresponding pyrrole monomer and was used as substrate for the immobilization of enzyme. We have fabricated microstructures using Multi-Exposure and Single Development (MESD) and electroplating technology. By varying exposure time, control exposure depth, and using multiple photomasks with different exposure times and single final development, can make a multi-depth 3-D photoresist image. After the mold patterning, metal electroplating is performed on it until metallic microstructures are obtained. This method has merits in that it is very simple, it needs only conventional photomasks and a common UV system.
8. As many genome projects have proceeded, the complete sequences of nearly a dozen microbial genomes are known and also complete genome sequences of metazoans including human genome are expected to be known in the near future. Current biology focuses on how these huge sequence information can be used. That is, main trend in biological research turns from structural DNA analysis to cellular effects and functional consequences of the DNA sequences. Recently developed DNA chip has emerged as a prime candidate for the performance of such analyses in molecular biology. Combined with mechanics, computer, bioinformatics and advanced technologies, DNA chip technology has robustness, accuracy, automation, and many applications. For making DNA chip for gene expression monitoring, we developed

microarrayer applying automatic system. The robot is designed to automatically collect samples from 96- or 384-well microtitre plates with up to 16 pens simultaneously and deposit them on modified slide glass. This is followed by a wash/dry operation and the cycle is repeated with a new set of samples. This system can deposit cDNA with interval of $200\ \mu\text{m}$ and size of $75\sim 150\ \mu\text{m}$, and high density DNA chip of 4,900 ea/ 3.24cm^2 (cover glass size) can be made. The system is controlled by a Visual C++ program running in a pentium computer. We selected *E. coli* W3110 as a target strain, and 70 kinds of genes, which are related to glycolysis, TCA cycle and heat shock response, were synthesized by PCR method. Primer program was made for determining primer sequence. In this study, expression procedure for gene expression monitoring by using DNA chip were established and we monitored expression of genes under heat shock condition.

C O N T E N T S

Abstract	iii
Summary (English)	vii
Contents (English)	xi
Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. State of the art	11
Chapter 3. Results and discussions	23
Chapter 4. Achievement and contribution	95
Chapter 5. Application plan	101
Chapter 6. References	105

여 백

목 차

요약문	iii
SUMMARY	vii
CONTENTS	xi
제 1 장 서 론	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	23
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	95
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	101
제 6 장 참고문헌	105

제 1 장

서 론

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절: 연구개발의 목적

1. 연구개발의 최종 목표

정보전자 및 의학분야의 Biochip 기술 개발

- 주요 질환의 진단 지표로 사용 가능한 혈액내 특정 단백질 및 포도당을 측정하는 전기화학식 바이오센서의 개발
- 생물전자소자 (bioelectronic device)의 기반 기술 확립

- 제 1 분야: DNA chip 시스템의 개발 (의과학연구센터 유육준)
- 제 2 분야: LDH (Lactate Dehydrogenase), AST (Aspartate Aminotransferase), Glucose 측정용 전기화학식 후막형 멀티 바이오센서의 개발 (생물과학과 김학성)
- 제 3 분야: 자기조립 생체분자의 전기화학적 특성연구 (화학과 곽주현)
- 제 4 분야: 생화학적 다이오드 성질을 갖는 소자재료의 개발 (화학과 이영훈)
- 제 5 분야: 미소영역에서의 극미량 bio-object의 이송을 위한 기본요소 및 미소현상 연구 (기계공학과 조영호)
- 제 6 분야: 다중 센서 신호 처리에 관한 연구 (전기 및 전자공학과 이수영)
- 제 7 분야: Multi-biosensor를 위한 미세 구조 연구 (전기 및 전자공학과 한철희)
- 제 8 분야: Gene expression monitoring을 위한 실험방법의 확립 및 DNA chip 제작 (화학공학과 이상엽)

2. 연구개발의 연차별 당초 목표

가. 제 1 분야

(1) 1차년도 (1997)

- 암 지표 단백질 측정용 전극 제작
- DNA microarray chip 제작에 관한 기초 연구

(2) 2차년도 (1998)

- DNA의 효과적인 고정기술 개발
- DNA microarray scanner의 개발

나. 제 2 분야

(1) 1차년도: 후막소자기법을 이용한 바이오센서 제작시스템의 구축

- ##### (2) 2차년도: 제 1 차년도 연구개발 결과 구축된 바이오센서 제작시스템을 이용하여 LDH, AST 및 glucose를 측정 대상물질로 하는 각각의 바이오센서의 개발

다. 제 3 분야

- (1) 1차년도 : 생체분자 단분자막의 형성방법에 관한 연구
- (2) 2차년도 : 생체분자의 단분자막 및 다층분자의 물리적 특성규명 및 자기 조립 생체분자의 전기화학적 특성연구

라. 제 4 분야

- (1) 1차년도: 고체표면에 전자전달 생체 고분자의 층을 형성하게 하여 생화학적 다이오드 성질을 갖게 하는 소자재료를 개발하기 위하여 적절한 생체고분자 monolayer 소자재료의 합성방법 개발
- (2) 2차년도: fusion 단백질의 정렬을 위한 nitrilotriacetic (NTA) group을 말단에 가지고 있는 thiol의 합성과 다양한 전자 전달 단백질에 대한 조사를 통해 이들을 재조합 형태로 합성하고, 이들 단백질의 전기 화학적 특성을 조사

마. 제 5 분야

- (1) 1차년도: 기본 요소 연구 및 미소현상 기초 시험
- (2) 2차년도: 요소 제작 및 미소유동의 실험적 분석

바. 제 6 분야

- (1) 1차년도: 다중센서 신호처리 기술의 확립
- (2) 2차년도: 다중센서 신호처리를 위한 실리콘 ASIC의 개발

사. 제 7 분야

- (1) 1차년도: 효율적인 마이크로 채널을 형성하기 위한 식각 공정 및 미세 전극구조 형성법 확립
- (2) 2차년도
 - 미세 전극 구조에 효소를 부착하고 패턴을 형성하는 방법에 대해 연구
 - Multi 전극 구조 형성 방법 연구
 - 마이크로채널과 반응 챔버, 전극 구조의 집적화 방법 연구

아. 제 8 분야

- (1) 1차년도: 없음 (2차년도에 신규 참여)
- (2) 2차년도: DNA chip을 활용한 특정 세포작용과 세포내의 생리 및 대사 연구
 - Gene expression monitoring을 위한 실험방법 확립
 - DNA chip의 제작

제 2 절: 연구개발의 필요성

1. 바이오칩의 정의

- 바이오칩이란 작은 공간 내에 정밀 가공 기술, 반도체 제조 기술 또는 나노 테크놀러지를 이용하여 생체 분자를 집적해 넣거나 또는 생물학적 원리를 이용한 작용이 일어나도록 구현한 것으로 질환 진단, 유전자 분석, 미량 물질의 분석, 측정 및 정보 처리 등의 목적에 활용 가능한 첨단 소자임.
- 현재 가장 실용화되어 있는 부문은 바이오 센서와 DNA chip 분야로서 이미 의료 진단 분야에서 상당한 시장을 형성해 나가고 있음.

2. 바이오칩 기술의 성격

- 바이오칩 기술은 생명과학, 물리학, 의학, 화학 등 기초 학문 분야와 전자공학, 미세가공, 광학 등 여러 분야간의 융합에 의해서만 발전 가능.
- 차세대의 유망산업으로 확실시되는 생명공학산업과 정보통신 및 나노테크놀러지의 복합적인 형태임.
- 기술 집약형 산업으로서 우리 나라의 기술 분야 현황으로 볼 때 단시간 내에 특화 시켜 선진국 수준으로 끌어올리기에 매우 적합함.
- 단기적으로는 질환 진단용의 센서 칩 또는 DNA chip으로 활용 가능하며 기존의 반도체 칩을 대체할 수 있는 고밀도, 저전력 소모형의 바이오칩 개발로 연결할 수 있음.

※ DNA chip의 예

1) DNA chip 제작 기술

- 유전자 검색, 분석: 분자생물학, 생물정보학, 유전체학 (genomics), 의학
- DNA의 분리 및 화학합성: 유기화학, 생화학
- DNA chip 제작: photolithography(반도체 제조 기법), 정밀 가공 및 기계 제어

2) DNA chip 판독기

- 스캐닝 및 형광 검출 시스템: 광학, 전자공학
- Chip image 분석: 디지털 이미지 처리 기술, 소프트웨어 공학, 데이터 베이스 처리 기술, 생물정보학

3. 바이오센서 연구의 필요성

바이오센서란 효소, 항원-항체, 미생물 등의 생물물질을 적합한 transducer에 결합하여 특정 생체활성물질의 농도를 측정하는 장치를 일컫는다. 생체물질은 고정화된 형태로 transducer와 결합하여 특이한 화학반응을 매개하며 transducer는 이러한 반응을 monitoring이 가능한 신호로 전환하는 역할을 수행한다. 바이오센서는 채용되는 효소 또는 항원-항체 반응 등의 특이성으로 인하여 복잡한 조성을 띠는 혈액, 혈장, 변, 식품 중의 특정성분만의 측정이 가능하므로 측정시 요구되는 시료의 전처리과정을 극소화할 수 있으며 신속하고 정확한 측정이 가능함으로 인해 임상분석, 환경, 공정제어 등의 분야에서 그 응용이 날로 증대되고 있다. 특히 임상측정의 분야에서 응급 상황의 환자 또는 환자의 자가측정 등의 필요에 의해 미소화, 고감도화된 저렴한 바이오센서의 개발이 요구되고 있다. 이러한 목적에 부합되는 바이오센서의 개발을 위해 일회용의 전기화학식 바이오센서에 대한 연구가 활발히 수행되고 있으며, 현재 몇 가지 종류의 바이오센서가 이미 상용화되어있는 상황이다. 바이오센서의 상용화를 위해서는 제작된 바이오센서는 응답의 재현성을 확보할 수 있어야 하고, 대량생산이 가능하며, 또한 제작가격이 저렴하여야 한다. 이러한 관점에서 screen printing을 이용한 후막소자기법을 바이오센서의 제작에 적용한 thick-film type의 바이오센서의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 임상의학적으로 중요한 의미를 지니는 LDH, AST 및 glucose의 혈중농도를 동시에 정확하고 신속하게 측정할 수 있는 멀티 바이오센서의 개발을 목표로 한다. LDH, AST의 경우, 심장 또는 간 등의 장기에 질환이 발생하였을 경우, 그 농도의 변화는 서로 상호보완적인 역할을 하므로 이들을 함께 판단하는 것이 바람직하다. 또한 세포 대사에 있어 필수적으로 작용하는 glucose 역시 많은 질환의 지표물질이 되므로 이들을 통합하여 측정할 수 있는 멀티 바이오센서의 개발은 중요한 의미를 지닌다 할 수 있다.

4. 생화학적 전자소자의 개발

Biochip 기술의 기본 개념은 궁극적으로 한 개의 생체 분자가 개별적으로 전자소자로서 역할을 할 수 있도록 하는 것이다. 이를 위하여 다양한 고체표면에 이러한 생체분자를 정렬하는 방법의 고안은 매우 중요하고 가장 기본적인 문제이다. 특히 각각 다른 redox potential을 갖는 전자 전달 생체 고분자로 코팅된 전극들의 redox potential의 차이를 이용하면 rectifier, transistor, 및 switch의 기능을 갖는 장치를 유도해 낼 수 있다. 이를 위해 생체분자들의 제조와 소자적 기능 연구가 필요하다. 특히 전자 전달 단백질을 제조합 단백질로 대장균에서 발현시킬 수 있다면 단백질의 다양한 변형이 가능해져 생화학적 소자재료 개발에 다양성을 줄 수 있다.

5. MEMS 기술을 이용한 바이오칩 개발

마이크로머신 기술을 이용한 극소형 Biochip은 극미량의 bio-object를 정밀 제어하여 신속하고도 다양한 분석을 가능케 하며, 특히 극미량 시약 공급을 위한 micro-doser와 micro-dispenser, 극미량 bio-object의 종합적 분석을 위한 micro-TAS (Total Analysis System 및 미소 DNA 증식기 및 미소 유전자 분석기

개발에 효율적인 방법을 제공한다. 이러한 극소형 다기능 Biochip 개발을 위해서는 미소 채널 등의 통로를 따라 극미량의 bio-object를 안정적으로 운송할 수 있는 on-chip bio-object 공급기 혹은 이송시스템의 개발이 필수적으로 요구된다. 이를 위해서는 미소영역에서 극미량의 bio-object 이송을 위한 미소 채널, 미소 밸브 및 미소 펌프 등 기본 요소의 개발과 이와 관련된 미소 유체 및 박막소재의 물성, 그리고 미소영역에서의 미소 유체의 특성에 관한 현상적 기초 연구와 실험적 분석연구가 필요하다.

6. 미세 가공 기술을 이용한 진단용 바이오센서의 개발

현대인의 삶에 있어서 건강에 대한 관심이 증가되고 있고 건강유지를 위한 질병의 진단이 필수적인데, 질병과 관련된 진단의 일환으로 이용되는 혈액의 분석은 보통 병원에서도 가능하고 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 그러나 값싸고 이동성이 큰 바이오센서를 개발한다면 사고나 응급시 빠른 분석을 할 수 있고 크기도 작고 가볍기 때문에 언제 어디서나 분석이 가능하게 된다.

미세가공기술이 반도체 집적회로기술과 융합되어 생체 의학, 보건 등에의 응용이 점차 다양화되어 가고 있다. 지금까지의 연구 형태가 기술의 응용 면에서 주로 보아왔기 때문에 실제 응용에서는 매우 제한적이었으나, 점차 수요자 즉 의학, 의과학, 의공학을 연구하는 그룹에서 응용분야를 찾고 미세가공기술 분야의 사람들이 공동으로 기술을 개발하는 형태가 되면 의료, 보건분야의 연구가 매우 활발해지고 시장규모도 또한 기하급수적으로 증가할 것이다.

매우 발전된 미세가공기술을 바이오센서의 개발에 응용한다면, 기존의 포도당측정 센서보다 작고 기능이 뛰어나며, 혈액채취시 통증을 줄일 수 있는 센서를 대량생산을 할 수 있으므로 값싸게 생산할 수 있을 것이다. 반도체 공정을 이용한 센서의 구현으로 저렴한 가격의 신뢰도가 높은 바이오센서를 제작 할 수 있다.

7. Gene expression profile 연구 필요성

Human genome project를 포함한 많은 생물체들의 genome project가 수행되고 있어 이로부터 수많은 유전정보가 쏟아져 나오고 있다. 이에 따라 얻어지는 생명체들의 유용한 정보를 이용하는 산업분야는 생명체 기원에 대한 정보를 얻게 하고 나아가 인간을 질병으로부터 해방시킬 수 있는 가장 유력한 방법으로 제시되어지고 있다. DNA chip은 각종 생명체가 가지고 있는 방대한 양의 유전정보를 빠른 시간에 대량으로 분석, 처리할 수 있게 하는 강력한 신기술이다. DNA chip은 지금까지 알지 못했던 유전자들의 상호 연관성을 규명하는 실험적 수단으로 최근에 개발된 유전정보를 분석할 수 있는 여러 방법 중 가장 주목받고 있는 방법이다. 이는 DNA chip이 짧은 시간에 많은 양의 정보를 나타낼 수 있으며 자동화가 용이하기 때문이다. 현재의 DNA chip 기술은 '생물체의 응용 용도 도출-시료준비-생화학반응-검출-Data visualization 과 해석'의 5단계로 구성되어지고 있지만 차세대에는 보다 간략화 되고 빠른 시간에 분석, 처리가 가능할 것이다.

DNA chip의 일반수요자 용도는 각 개체의 유전자의 차이분석을 이용한 개개인의 질병예측, 약물감수성 등의 체질진단에서 큰 시장을 형성할 것이고, 질병진단, 모든 병균들의 진단과 분석, 각종미생물의 동정, 식물, 동물의 품종 구별 등에서 새로운 상

품군을 형성하기 시작하였다. DNA chip은 연구용으로 주로 신약 개발을 주로 하는 대형 제약 회사에서 대량으로 사용되고 있다. 각 세포에서의 유전자 발현상태를 조사함으로써 의학 후보 단백질을 탐색하고 약물의 효능 평가에도 사용되고 있다. 그러므로 모든 세계의 대형 제약 회사들이 이 기술의 중요성을 인식하여 DNA chip 관련 회사에 막대한 연구비를 투입하고 있다. 또한 특정 질병치료에 관계된 유전자에 대해서는 원천 특허를 획득하고 있다. 이들을 이용하기 위해서는 고가의 사용료를 지불해야 함은 물론이다. 이는 DNA chip의 개발 없이는 생물공학 및 의료 분야에서의 세계 경쟁력을 기대할 수 없음을 의미한다. 그러나, DNA chip이 상대적으로 최근에 각광받기 시작한 기술임을 고려할 때, DNA chip 기술을 독자적으로 개발하였을 경우 생물 관련산업의 획기적인 발전을 가져올 수 있을 것으로 보인다.

최근 경제적으로 어려운 상황을 겪고 있는 국내 산업은 앞으로 지식기반 산업인 정보통신과 생물공학 분야에 집중 투자함으로써 국제경쟁력 확보가 시급히 요구되는 상황이다. 앞으로의 생물공학은 그 원천기술인 유전자 정보의 해석과 가공이 매우 중요한 역할을 하게 될 것이며, 이를 보다 효율적으로 가능케 하는 것이 DNA chip 관련기술이다. 국내에서는 DNA chip의 개념과 그 중요성이 소개되어 있으나 학계에서의 연구는 초기단계이며 연구 인력층이 취약한 실정이다.

현재까지의 DNA chip 관련연구는 초기단계라고 할 수 있으며, 미국과 유럽이외의 국가에서는 DNA chip관련 연구가 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 DNA chip 연구의 기초연구로서 수행된 DNA chip의 제작과 gene expression monitoring을 위한 실험방법의 확립은 보다 심도 깊은 연구로 이어질 경우, 본 분야에 대한 기술 선점의 우위를 차지하여 DNA chip 관련시장에서 매우 유리한 위치를 차지할 수 있을 것이다.

제 3 절: 연구개발의 내용 및 범위

1. DNA chip 시스템의 개발 (의과학연구센터 유육준)

가. 암 지표 단백질 측정용 전극 제작

- 면역 바이오센서용 전극과 mediator 선정
- 용액중의 산화환원 효소에 의한 과산화수소의 전기화학적 환원

나. DNA microarray chip 제작에 관한 기초 연구

- DNA 고정, 형광 검출 및 스캐닝 방법에 관한 기초 조사
- 진단용 유전자의 선정 및 설계

다. DNA microarrayer의 제작

- 컴퓨터로 제어하는 3축 직교 로봇과 마이크로 스포팅 핀을 이용
- 최적 스포팅 조건 확립

라. DNA microarray scanner의 제작

- 단일 광원과 stage scanning system 및 photomultiplier tube 이용
- 스캐닝 결과의 영상 파일화 및 저장

2. LDH(Lactate Dehydrogenase), AST(Aspartate Aminotransferase), Glucose 측정용 전기화학식 후막형 멀티 바이오센서의 개발 (생물과학과 김학성)

가. 후막기술의 적용을 통한 바이오센서의 제작.

- 바이오센서의 제작을 위한 screen template의 설계 및 제작
- Working ink composition의 결정

나. 효소반응결과 생성되는 NADH에 대한 효과적인 electron transfer mediator의 탐색 및 적용

- NADH의 전기화학적 특성 탐색
- Electron transfer mediator의 전기화학적 특성 탐색

다. 대상시료인 LDH, AST 및 glucose 측정용 바이오센서의 개발 및 실제 적용 가능성 탐색

3. 자기조립 생체분자의 전기화학적 특성연구 (화학과 곽주현)

가. 자기조립 생체 분자를 이용한 전극 제작 및 특성 조사

- thiol 분자의 황 (Sulfur)이 표면에 자기 조립 박막층을 만드는 것을 이용하여 thiol modified 전극을 만들고 생체 분자를 배열
- Modifier를 통한 금전극과 생체분자 사이의 전자 전달 현상 연구
- 전기화학적 활성의 작용기를 가지는 thiol분자의 합성
- 금전극 상에 생체분자를 이용하여 직렬, 병렬 회로를 구성하고 전자 전달 반응의 특징을 조사
- STM (Scanning Tunneling Microscopy)로 실험에 쓰인 금 전극의 표면, 그 전극 위에 올려진 thiol의 단분자층 표면, 그리고 그 단분자층 위에 올려진 생체분자의 morphology를 연구

나. striping voltammetry 기술을 이용한 극미세전극 chip의 전기화학적 특징 연구.

4. 생화학적 소자 재료의 합성 (화학과 이영훈)

가. 재조합 ferredoxin 단백질의 합성: 대표적인 전자 전달 단백질인 mouse와 *Bacillus*의 ferredoxin을 재조합 단백질 형태로 제조하고 전기 화학적 특징을 조사

나. 금 전극 위에서 전자 전달 단백질들을 고정화시키고 이들의 전자 전달을 가능하게 하기 위해서 다양한 길이의 carboxyl terminated thiol을 합성

다. His-tag 재조합 단백질을 금전극에 고정시킬 수 있는 NTA-terminated thiol의 합성

라. 재조합 cytochrome b5와 bacterioferritin 단백질의 제조

5. 미소영역에서의 극미량 bio-object의 이송을 위한 기본요소 및 미소현상 연구 (기계공학과 조영호)

가. 극미량의 bio-object 이송을 위한 기본요소 연구 및 미소현상 기초실험

- 극미량 bio-object (혈액) 의 물성(표면장력, 밀도) 에 관한 실험적 측정 및 분석
- Micro-channel 및 diffuser의 설계, 제작 및 분석

- 극미량 bio-object의 유동 발생을 위한 미소 구동원리 및 미소 박막재료 연구
- 나. 미소 요소의 설계, 제작 및 미소 유동의 현상학적 실험 연구
 - micro bio-object 이송을 위한 micro-pump의 설계, 제작 및 시험
 - micro bio-object 유동의 방향성 제어를 위한 micro-diffuser valve 연구

6. Multi-biosensor를 위한 미세구조 연구 (전기 및 전자공학과 한철희)

- 가. 마이크로 채널 형성을 위한 식각 연구
 - 마이크로머시닝기술을 응용한 마이크로 채널 형성을 위한 식각 연구
 - 새로운 마이크로 삼차원 구조물 형성 기술을 제안
- 나. 미세전극 형성 연구
 - 기존의 반도체 집적회로 공정 기술인 금속 증착법과 사진현상공정, passivation 기술, 및 lift-off공정 등을 응용하여 미세전극 구조를 형성하는 방법 연구
- 다. 미세 전극 구조에 효소를 부착하고 패턴을 형성하는 방법에 대한 연구
 - 효소의 부착을 위하여 전기중합방법을 이용하고 multi 전극 형성에 응용하기 위한 개선 방법과 새로운 효소 부착 방법에 대해 연구
- 라. Multi 전극 구조 형성 방법 연구
 - 동시에 여러 물질의 측정을 위한 각각의 전극을 만들어서 집적하는 방법으로 금속 증착과 lift-off공정의 multi 전극에 응용하기 위한 방법에 대해 연구
- 마. 마이크로채널과 반응 챔버, 전극 구조의 집적화 방법 연구
 - 니켈도금을 이용한 마이크로채널과 반응 챔버, 그리고 미세 전극 구조의 집적화 방법 연구

7. 다중 센서 신호 처리에 관한 연구 (전기 및 전자공학과 이수영)

- 가. 신경회로망 학습에 의한 다양한 응용 신호처리 기술 연구
- 나. 실리콘 ASIC의 세부설계 및 제작
- 다. 실리콘 ASIC을 검증하기 위한 보드의 제작

8. Gene expression monitoring을 위한 실험방법의 확립 및 DNA chip 제작 (화학공학과 이상엽)

- 가. Gene expression monitoring을 위한 실험방법 확립
 - Gene expression monitoring을 위한 mRNA 분리 및 표지법 확립
- 나. DNA chip의 개발
 - 자동제어 시스템을 이용한 DNA microarrayer의 제작
 - 대상 유기체의 유전자 합성 및 고정
 - Gene expression monitoring의 기초 연구 수행

제 2 장

국내외 기술개발 현황

여 백

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 DNA chip technology의 기술 개발 현황

가. 국외의 경우

DNA chip 기술은 이미 확보되어 있는 genome information과 이를 분석, 가공하는 기술 및 칩 제작과 판독 및 시스템화에 관련한 하드웨어 부분의 종합으로 구현되는 첨단 분야이다. 특히 올해에는 이를 이용한 신상품들이 속속 시장에 선을 보이고 있으며 이른바 "Biochip Industry"라는 새로운 용어도 등장하고 있다. 특히 MEMS 분야에서는 이 기술을 biological material과 결합시켜 지금까지는 다른 개념의 바이오칩을 개발하고자 하는 적극적인 움직임을 보이고 있다.

(1) Genome information database

1999년 현재까지 효모를 비롯한 17 종류 생물체에 관한 완전한 genomic sequence가 밝혀져 있으며¹⁾ 인간의 경우는 인체 게놈 프로젝트가 1차적으로 끝나는 2003년 정도에 전체 염기서열 정보가 확보될 예정이다²⁾. 올해 5월 현재의 진척도는 9%로 집계되고 있으나 약 6만 - 8만개에 이를 것으로 추정되는 유전자의 위치와 기능을 파악하는 것은 인류의 계속적인 숙제라 할 수 있다. 전통적인 클로닝 방법으로 돌연변이가 일어난 유전자를 찾아내고 기능을 확인하는 방식으로 하여 지금까지 밝혀낸 유전자의 수는 이제 7000개 정도에 불과하다. cDNA pool에서 무작위로 골라낸 유전자 단편의 자동 염기서열 분석에 의해 얻어진 expressed sequence tag (EST)는 학계와 기업간의 노력으로 약 240만개에 가까운 데이터가 축적되어 있으며(1999년 5월 7일 현재) 이중에서 사람의 것은 약 절반에 해당한다³⁾. 그런데 지금까지 연관성 없이 단순 축적되던 GenBank⁴⁾ 및 EST entry들을 컴퓨터로 분석하여 자동적으로 개별적인 클러스터 (곧 하나의 단백질을 암호화하는 단위 유전자)로 분류하는 것이 가능해졌다. 이러한 UniGene database⁵⁾는 사람과 생쥐 및 랫에 대하여 작성되어 있으며 매우 유용하게 쓰이고 있으나 automatic gene clustering 방법이 아직 완전하지 않다는 점을 유의해야 할 것이다.

이상에서 열거한 genome sequence information들은 모두 미국의 NCBI (National Center for Biotechnology Information)을 통해 공개되어, 허가를 받은 업체를 통해 cell clone이나 DNA의 형태로 구입할 수 있다. 이와는 별도로 일부 제약업체에서는 자체적으로 분리 동정한 cDNA 클론을 확보하고 있으나 상업적 목적으로 활용하기 위해 별도의 회원 업체 이외에게는 공개를 하지는 않고 있다.

(2) Microarray chip system의 개발 및 상용화

1995년 스탠포드대의 패트릭 브라운 연구실에서는 48 종의 cDNA 시료를 3차원 로봇을 이용하여 슬라이드 글라스에 정밀하게 인쇄한 "microarray chip"을

개발하여 Arabidopsis의 differential gene expression pattern을 정량적으로 확인한 최초의 연구 결과를 보고하였으며⁶⁾ 점차 microarray chip의 인쇄 밀도를 높여나가면서 yeast의 전체 ORF⁷⁾ 및 사람의 expression array (10,000개⁸⁾)까지 제작하여 활발한 연구활동을 벌이고 있다. 특히 microarrayer robot을 제작하는 가이드를 인터넷에 공개함으로써⁹⁾ 전세계의 연구자들이 직접 실험실 수준에서 array를 만들어 사용하는데 크게 기여하였다. 작년도부터는 많은 기업들이 나름대로의 특성을 지닌 microarrayer와 chip scanner 들을 상품화하고 있으며 array를 만드는데 필요한 여러 가지 소모성 물품이나 분석용 소프트웨어들을 시판하기 시작하였다. 특히 chip scanner의 경우는 제작 정보가 별로 공개되어 있지 않기 때문에 많은 연구자들이 시판되고 있는 장비에 크게 의존하는 추세이다. 따라서 본 연구과제에서는 chip scanner를 자체 개발하면서 관련한 knowhow를 축적하는데 주력하였다.

Spotting type의 microarray 칩과는 별도로 미국의 Affymetrix사는 반도체 제조 기술의 일종인 사진 식각술 (photolithography)을 이용, 유리판 위에 직접 고밀도로 oligonucleotide를 합성하는 방법¹⁰⁾을 개발하여 1996년에 최초의 상품을 출시하였으며 현재는 Amersham Pharmacia Biotech이 GeneChip 제품군의 마케팅을 담당하고 있다. Nanogen사가 개발한 semiconductor microchip은 미세한 전극에 전기장을 가하여 sample handling과 hybridization stringency를 조절할 수 있는 독창적인 제품으로, 대량 생산을 위한 일회용의 칩 카트리지를 최종 설계하였으며 스캐너와 fluidics station을 개발 완료하였다¹¹⁾. 1997년 말에는 Molecular Dynamics와 Affymetrix에 의해 GATC (Genetic Analysis Technology Consortium)¹²⁾가 결성되어 array 기반 유전자 분석의 표준을 마련하기 위한 작업이 진행중이며 현재 분석 소프트웨어의 기초안(Ver. 1.0)을 평가중이다. 1998년 3억 달러 정도였던 microarray의 세계 시장 규모는 2010년에는 150억 달러 규모로 성장할 것으로 보이며, 소형화, 집적화, format의 표준화 및 비용 절감의 방향으로 나아가는 추세이다.

-Pre-made filter or array

전년도까지만 해도 연구자가 구입할 수 있는 array는 유전자들을 filter에 고정한 것뿐이었으나, 1999년 4월에 NEN에서는 2400개의 인체 cDNA를 microarray의 대표적인 format으로 자리잡은 슬라이드 글라스에 고정한 MICROMAX를 발표하였다. Clontech에서는 올 상반기에 슬라이드 글라스 포맷의 array를 시판할 예정으로 알려지고 있다. 기술과 비용 면에서 직접 array를 만들어 쓰기에 곤란했던 일선 연구자들에게 완제품 형식의 칩은 큰 호응을 받을 것이 확실하며, 이와 동시에 chip scanner의 시장도 확대될 것으로 사료된다.

(3) Genome information과 DNA chip data의 생물정보학적 접근

자동 염기서열 분석기와 같은 high-throughput 분석장비가 발달하고 이로부터 엄청난 양의 정보가 쏟아지면서 비교적 신중 학문인 “생물정보학(Bioinformatics)”의 중요성이 강조되고 있다. 생물정보학이란 컴퓨터를 주된 도구로 이용하여 생명과학 분야의 연구 개발에 적용하는 다양한 연구분야의 총칭이다. 이는 유전자 정보 데이터 베이스를 어떻게 정리하고 어떻게 검색하느냐

하는 기본적인 문제 해결의 도구이자 이론적 기반일 뿐 아니라, 이제는 확보되어 있는 유전자 정보만을 가지고도 전산학적 도구를 이용하여 생물학적 원리를 밝히는 것이 가능할 만큼 방대한 양의 데이터를 축적하게 된 것이다. DNA chip도 예외일 수는 없다. 확보된 유전자 데이터 베이스에서 array chip으로 제작할 클론들을 선별해 내고, 각각을 증폭할 PCR 프라이머를 설계하고, hybridization 결과 얻은 방대한 데이터를 관리, 분석하는데 생물정보학이 필수적임은 두말할 나위도 없다. 최근 미국 등 선진국에서는 생물정보학 분야에 대한 학위과정을 신설하고 있으며, 많은 생명공학 관련 기업 (약학, 화학, 제약, 농업 등)에서는 경쟁적으로 생물정보학 전문가를 고용하고자 노력하고 있으나 공급이 수요를 따르지 못하는 상황이다.

나. 국내의 경우

최근 1년간 국내에도 DNA chip의 원리와 활용 방안이 널리 소개되어 올해부터는 일반 연구진과 의료계를 중심으로 하여 microarray와 scanner의 도입을 적극 추진하고 있다. 특히 국내의 DNA chip 시장을 선점하려는 외국 회사들이 마케팅에 총력을 기울이고 있다. 그러나 대부분은 end-user의 입장에서 chip을 연구나 진단에 활용하려는 경향이 강하고 직접 필수 장비나 산업화 소재를 개발하려는 노력은 일부 벤처 기업을 제외하고는 아직 미흡한 실정이다. 최근 SJ 하이테크와 바이오니아에서 microarray를 개발 완료한 것 이외에는 본 연구에서와 같이 microarray와 scanner를 동시에 개발한 사례는 아직 없다. 특히 장비 개발 측면에서 본 연구는 KAIST 내에서 활용 가능한 광학, 전자, 기계공학 등의 각 요소 기술을 종합하여 얻은 본격적인 성과라는데 큰 의의가 있으며, 국내에서 보유한 각 요소기술은 이미 상당한 수준에 올라 있으므로 본격 협력 연구 체제가 마련되면 미래의 고부가가치 산업으로 주목받는 생명과학산업 분야에서 세계적인 경쟁력을 갖추는 데 손색이 없으리라고 판단된다.

그러나 DNA chip instrumentation을 구현할 국내 기술 수준에 비해 상대적으로 생물정보학 분야는 매우 취약하다. 기존 제도권 생물학 교육을 받은 소수의 인력이 자력으로 이 분야를 개척하거나 한 두 대학에서 생물정보학에 관한 기초 수준의 강좌를 마련하고 있는 실정이다. 생물과학(또는 전산학)의 전공자가 상대 분야를 어렵게 다시 학습하는 것 보다 두 분야를 망라하는 체계적인 교육을 실시하는 것이 시급한 문제이지만 생물정보학에 대한 국내의 인식과 전문인력 수준으로는 당장은 어려울 것으로 생각된다. 생물과학과 전산학 두 전문분야 사이에서 공통 관심사를 도출하고 협력 방안을 모색해 나가는 것으로부터 출발하는 것이 바람직할 것으로 판단한다.

1. Custom-built microarrayer
 - o Pat Brown lab (Stanford Univ.): <http://cmgm.stanford.edu/pbrown>
 - o Albert Einstein College of Medicine (AECOM):
<http://sequence.aecom.yu.edu/bioinf/funcgenomic.html>
 - o Vivian Cheung lab (The Children's Hospital of Philadelphia):
<http://w95vcl.neuro.chop.edu/vcheung>
2. Middlewares
 - o Clone set vendors
 - + Genome Systems: <http://www.genomesystems.com>
 - + Research genetics: <http://www.resgen.com>
 - o Filter vendors
 - + Research genetics: <http://www.resgen.com>
 - + Clontech: <http://www.clontech.com>
 - o High-density microarray vendors
 - + Affymetrix: <http://www.affymetrix.com>
 - + Incyte: <http://www.incyte.com>
 - + NEN Life Science: <http://www.nenlifesci.com>
3. Instrumentation
 - o Microarrayer
 - + Cartesian Technologies: <http://www.cartesiantech.com>
 - + Genetic Microsystems: <http://www.geneticmicro.com>
 - + Genomic Solutions:
http://www.bioportfolio.com/erbi/genomic_solutions.htm
 - + BioRobotics: <http://www.biorobotics.com>
 - + Genetix: <http://www.genetix.co.uk>
 - + GeneMachines: <http://www.genemachines.com/>
 - o Chip scanner
 - + Packard: <http://www.packardinst.com>
 - + General Scanning: <http://www.scanarray.com>
 - + Molecular Dynamics: <http://www.mdyn.com>
 - + Affymetrix: <http://www.affymetrix.com>
 - + Genetic Microsystems: <http://www.geneticmicro.com>
 - + Genomic Solutions: <http://www.genomicsolutions.com>
 - + Virtek Vision International: <http://www.virtek.ca>
 - o Total solution
 - + BioChip Technologies: <http://www.biochip.com>
4. Consumables
 - o TeleChem: <http://www.hooked.net/~telechem>
5. Softwares
 - o Scanalyze(Stanford University): <http://rana.stanford.edu/software>
 - o Biodiscovery: <http://www.biodiscovery.com>
 - o Molecular Dynamics: <http://www.mdyn.com>

제 2 절 바이오센서의 연구 동향

바이오센서의 상용화를 위해 요구되는 요소는 가격이 저렴하고 사용이 간편하며 어디서나 측정이 가능해야 한다는 점이다. 이러한 목적에 부합되는 바이오센서의 형태로 전극을 한번 사용하고 버리는 disposable strip type이 각광을 받을 것으로 기대되며 glucose 바이오센서의 경우 상용화되어 널리 이용되고 있다. Strip type의 바이오센서를 제조하는데 가장 필요한 기술은 시편(base substrate)위에 working electrode, counter electrode 및 reference electrode를 thick-film형태로 제조하는 것이며 이는 screen printing 방법으로 구현될 수 있다. Thick-film technology는 앞으로 바이오센서 시장에서 가장 크게 각광받을 것으로 예상되는 임상의학분야에서 diagnostic kit의 개발을 위해 필수적이라고 생각된다. Thick-film technology는 미세 전자회로의 제작에 이용되는 기술로써 이를 바이오센서에 적용할 경우 균일한 품질의 센서를 대량생산하고 크기를 미소화할 수 있기 때문에 바이오센서의 상용화를 위해 절실히 요구되는 기술이다. 본 연구에서는 바이오센서의 대량생산기술로서 적당한 screen printing technique을 이용하여 바이오센서를 제작하였고, 많은 바이오센서를 동시에 제작할 수 있는 특징으로 인해 낮은 생산비용의 일회용 바이오센서를 제작할 수 있게 되었다.

유럽을 비롯한 미국, 일본 등의 선진국에서는 바이오센서에 관한 연구가 1980년대 이후 활발히 진행 중이며 이들 선진국에서는 바이오센서시장이 지속적인 호황을 누리고 있다. 현재 이러한 센서들의 주 시장은 혈당과 요소 측정 분야이며, 혈당측정용 바이오센서의 시장은 연간 판매량이 수 억 달러가 넘는 독립된 시장을 이루고 있다. 이 밖에도 임신 진단시약, 콜레스테롤 측정용 바이오센서 등 비슷한 규모를 이룰 수 있는 가능성이 있는 잠재적 시장은 규모가 방대할뿐더러 그 종류 또한 다양하다. 최근 영국의 크랜필드 바이오테크놀로지(Cranfield biotechnology)사에서 예측한 보고서에 의하면 2000년까지 바이오센서 세계시장은 약 110 억 달러 정도로 확대될 전망이고 이중 혈당, 요소측정 및 자가 건강진단 장치 등 생물의료산업 관련분야가 80%를 차지하며 생물 및 식품제조 공정의 온라인 계측 및 환경분야가 나머지 20%를 점유할 것으로 예측하고 있다. 한편, 일본에서는 현재 정부차원에서 바이오센서의 개발에 많은 투자가 이루어지고 있는데 사람의 건강상태를 자동으로 진단할 수 있는 센서시스템의 개발을 위해 큰 전자회사들이 많은 연구와 투자를 계속하고 있다.

국내의 경우, 바이오센서에 관한 연구는 본 연구실에서 처음으로 수행되었고, 점점 그에 대한 관심이 높아지고 있으나 아직까지는 연구인력과 예산의 부족으로 연구수준이 외국에 비해 뒤쳐진 실정이다. 그러나 세계적인 추세로 볼 때, 바이오센서의 수요 및 공급은 그 부가가치성과 규모로 보아 국내에서의 독자적인 연구가 반드시 필요하다고 생각된다. 실제로 본 연구에서 수행되고 있는 멀티 바이오센서의 경우, 지금까지 유사한 연구의 예가 보고된 바가 없는 것으로 사료되기 때문에 성공가능성과 시장잠재력이 매우 크다고 할 수 있다.

제 3 절 생화학적 소자 연구의 현황

최근 생화학적인 소자의 연구는 전자 전달 단백질을 중심으로 많이 이루어지고 있다. 그 연구 방법이 최근에 들어서 크게 달라진 것은 없으나 전국 상에서 전자 전달 단백

질의 monolayer를 이용한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 다양한 전극과 특히 전극과 단백질사이의 promotor의 monolayer를 만들어서 단백질의 전기 화학적인 성질을 알아보는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

그러나 monolayer를 이루고 있는 단백질의 전자 전달이 이상적으로 일어나도록 환경을 맞추어주는 연구는 아직 미미한 상태이다. 또한 전자 전달 단백질도 주로 쉽게 자연에서 얻을 수 있는 단백질을 선택하고 있으나 재조합 단백질을 이용하는 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

제 4 절 MEMS 분야의 기술 동향

해외의 기술 동향을 살펴보면 유럽의 MEMS 프로그램은 지금까지 국제경쟁력을 유지해 오고 있는 소재기술과 의료기 관련산업의 기반을 이용하여 생체 및 화학센서 개발과 화학 및 의료용 미소펌프, 분석시스템 개발에 집중하면서 독일, 스위스, 네덜란드, 프랑스에서 각각 활발히 진행되고 있다. 또한 미국에서도 현재 DARPA MEMS 프로그램에서 지원하고있는 6분야 가운데 'Fluid sensing, control and transport'가 포함되어 있으며, 최근의 시장 변화와 밀접한 관계를 갖고 있는 미국 MEMS의 기술개발 흐름은 다음과 같다. 첫 번째는 극소형 제품의 가격 경쟁력을 위한 제조 및 패키징 기술개발, 두 번째로는 제품 개발의 가속화와 효율성 증대를 위하여 설계 및 시뮬레이션 CAD에 관심이 모여지고 있다. 마지막으로 기존의 자동차, 의료 및 센서 이외의 추가시장 확대를 위해 microfluidics/microvalve 등을 이용하여 물리적 환경과 접촉되는 새로운 분야를 개척해 가는 것이다.

<표 2-5-1> 의료·환경 분야 미국 MEMS 시장참여회사들의 시장참여수준

**Total MEMS Medical Market:
Company Rankings by Involvement in Segment (U.S.),
1996**

<i>Company</i>	<i>Ranking</i>
Affymetrix	3
Cardiovascular Imaging Systems	3
Cepheid	3
EG&G IC Sensors	1
Honeywell Micro	2
IBM	2
Lucas NovaSensor	1
Motorola*	1
SenSym	2
Silicon Microstructures	2
Texas Instruments*	2
Westinghouse	2

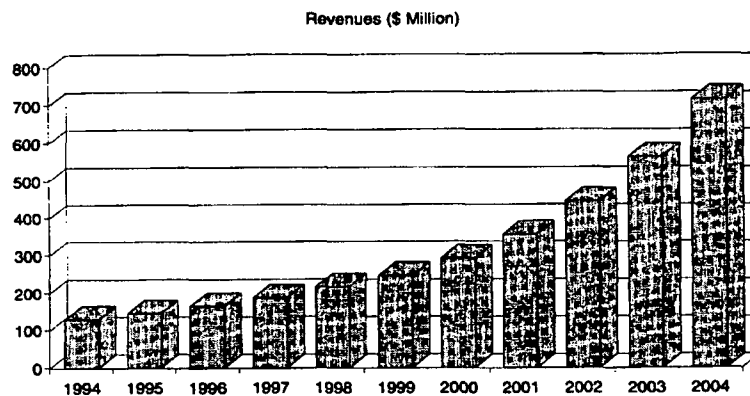
Key: MEMS = Microelectromechanical systems
Level 1 = Company has a significant market share in current MEMS medical market.
Level 2 = Company is active in MEMS medical industry and research.
Level 3 = Company is small and is developing niche medical MEMS technology.
** represents several divisions*

Source: Frost & Sullivan

1996년에 매출액이 1.6억 달러였던 의료·환경 분야 시장은 이 분야의 주요 제품인 Disposable blood pressure sensor의 지속적인 매출과 새로운 응용제품의 시장의 큰 성장으로 2004년에는 7.2억 달러까지 증가할 것으로 전망된다. 1996년에 12.5%이었던 시장의 증가율은 전체 예상 기간에 걸쳐 점점 증가하여 2004년에는 27.2%에 이를 전망이다. 이와 같은 증가 추세는 현재의 의료·환경 분야 시장이 형성 단계에 있으며 앞으로도 크게 성장할 가능성이 높음을 의미한다.

현재 의료·환경분야의 MEMS는 기존 기술의 대체보다는 MEMS 고유의 특성을 살려 장기적으로 현재의 복잡하고 어려운 부분을 해결할 혁신적인 접근에 주력하고 있다. 예를 들면, Invasive neural monitoring이나 PSM(Personal Status Monitoring)과 같은 분야는 거의 경쟁기술이 없는 높은 잠재력을 지닌 분야이다.

**Total MEMS Medical Market:
Revenue Forecasts (U.S.),
1994-2004**



Key: MEMS = Microelectromechanical systems

Note: All figures are rounded; the base year is 1996.

Source: Frost & Sullivan

그림 2-5-1. 의료·환경 분야 미국 MEMS 시장의 예상 매출액

제 5 절 미세 가공 기술을 이용한 바이오센서의 연구 현황

혈액내 포도당을 측정하는 방법은 1960년대 초에 처음으로 개발되었으며 최초의 휴대용 포도당 측정 소자는 1981년 상업적으로 가능하였고, 1980년대에 이 분야에 대한 기술들의 발전이 이루어지기 시작했다. 현재 혈액내 포도당을 측정하는 장치를 판매하는 회사는 여러 회사가 있으나, 전기화학적 원리를 이용한 장치는 i-STAT, Accu-check Advantage, Medisense, Life Scan 등의 회사가 있다. 국내에는 아직 이러한 제품을 생산, 판매하는 회사는 없으며, 개발단계인 회사들이 최근에 나타나고 있다. 그러나 현재의 판매되고 있는 제품들은 전극의 구조의 크기가 매우 크며(mm 크

기), 미세가공기술을 응용한 센서는 아직 제품 출시가 되지는 않은 상태로서 미국, 일본을 비롯하여 세계적으로 연구가 활발히 진행중이다. 국내에서도 마찬가지로 몇몇 대학에서 연구가 진행중이다.¹³⁾¹⁴⁾

하지만 현 기술상태는 혈액채취를 따로 하여 센서에 적정하여 그 값을 분석하는 회로 부분에서 데이터를 처리하고, 표시하는 방식으로 각각의 부분을 제작한 다음 packaging 공정을 통하여 제품으로 만드는 hybrid 제작 방법으로, monolithic하게 제작하지 못하고 있다. 본 연구에서는 마이크로 크기의 biosensor를 구조체와 모노리딕하게 제작이 가능하게 함으로써 기존의 센서의 단점을 극복할 수 있다고 하겠다.

여 백

제 3 장

연구개발수행 내용 및 결과

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절: 진단용 면역 센서 개발 및 DNA chip 시스템 개발

[연구 수행 방법]

1. 혈중 단백질 측정용 면역 센서 개발

가. 면역 바이오센서용 전극과 mediator의 선정

전기화학식 면역 센서에 시스템을 구성하기 위해 몇 가지의 전극(BAS glassy carbon electrode, BAS gold electrode)과 산화/환원 mediator(potassium ferrocyanide, ferrocene-monocarboxylic acid, potassium iodide)를 이용한 기본적인 cyclic voltammetry를 수행하였다. 반응액의 부피는 5 ml 또는 10 ml로 하였으며, 기준전극은 BAS Ag/AgCl reference electrode, supporting electrolyte는 0.1 M의 potassium phosphate buffer(pH 7.0)였다.

나. 수용액중의 산화환원 효소에 의한 과산화수소의 전기화학적 환원

전기화학식 바이오센서에는 안정성과 반응성이 우수한 glucose oxidase가 매우 널리 쓰이고 있으며 전극상에 고정하거나 화학적으로 변형시키는 여러 가지 방법이 알려져 있다. 그런데 horseradish peroxidase(HRP)는 일반적인 발색기질을 사용한 활성 검출이 용이하고 전통적으로 ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)나 Western blotting에 널리 사용되어왔기 때문에 여러 가지 특이성을 갖는 항체에 결합된 형태를 쉽게 구입할 수 있다는 장점이 있다. 면역 센서 시스템 구성을 위한 기초 자료를 얻고자 electrochemical cell에 수용액 상태의 HRP와 mediator 및 과산화수소를 첨가하고 기준전극에 대해 0.0V의 전압을 working electrode에 인가한 다음 과산화수소의 환원에 의한 환원전류를 측정하였다.

2. DNA microarray의 제작

DNA microarray의 기본 설계는 미국 스탠포드 대에서 공개한 <The MGuide>를 바탕으로 하되 되도록 국산 부품을 사용하고 성능 면에서 더 우수하도록 개량하였다. 가공물들은 원내 기술지원센터 부설 기계 공작실에서 직접 제작하였다. DNA microarray와 chip scanner는 Windows 98로 운영되는 한 대의 PC(Pentium-200 MMX, 64MB RAM, 8.4GB HDD)로 제어하였다.

가. Printing pin assembly

인쇄용 핀은 스테인리스 스틸로 된 "quill" type으로서 한국 와이어 커팅(대전, 한국)과 Majer Precision (Arizona, 미국)에서 구입하였다. 핀 헤드는 듀랄루민으로 직접 제작하였으며 핀의 원활한 상하 운동을 위해 내경 3 mm의 볼 부쉬(LM3, THK, 일본)를 헤드 아래쪽에 끼워 넣었다. 핀을 일정 수직 위치에 고정하

기 위한 스프링은 10 - 30 gf/mm의 것을 천우 스프링(서울, 한국)에서 주문 제작하였다.

나. 직교 로봇

스트로크가 800 x 500 x 200 mm인 국산 직교 3축 로봇(FARAMAN-RCM4M, 삼성전자)에 프린팅 핀을 고정시켜 시료 플레이트와 슬라이드 글라스 및 세척/건조 장치간을 이동하도록 하였다. 전체 시스템은 허니컴 구조가 들어있는 광학 정반(1200 x 1200 x 50 mm, 대일 시스템, 서울, 한국)에 고정하였다.

다. 로봇의 위치제어

PC-based 4축 범용 모터 컨트롤러 카드(MMC-PV4, 삼성전자)를 이용하여 microarrayer robot을 구동하였다. 핀 세척을 위한 펌프와 초음파 세척기는 카드에 부가된 디지털 출력 접점과 릴레이를 이용하여 작동시켰다. 로봇 구동 프로그램은 제작사에서 지원한 라이브러리를 이용하여 Borland C++ 3.1로 작성하였다.

2. DNA chip scanner

Chip 스캐너는 기본적으로 한 가지 형광물질을 검출할 수 있도록 단파장의 레이저를 장착하고 레이저 빔을 고정된 상태에서 칩을 raster pattern으로 움직여 2차원 영상을 얻어낼 수 있도록 설계하였다.

가. 레이저 원

Fluorescein 계열의 형광물질의 excitation에 적합한 488 nm의 단파장을 내는 10 mW급의 공랭식 아르곤-이온 레이저(2014-10SL, Uniphase, California, 미국)를 사용하였다. 전체 시스템은 광학정반(1000 x 800 x 50 mm, 남일광학기기, 인천)위에 조립하였다.

나. Optical system

각종 고정용 부속, 위치 조절용 수동 스테이지 등은 남일광학기기와 Newport Corporation(California, 미국)의 제품을 사용하였다. Dichroic beamsplitter(LWP-R488-T520-1025-45UNP)와 laser line filter(F6-488-4-1.00), color glass filter(CG-OG-515-2.00), 초점거리 150 mm의 singlet spherical plano-convex lens(PLCX-25.4-77.3-C) 및 visible laser mirror(BBD1-PM-1037-C)는 한국전광(경기도, 한국)의 제품을 사용하였다. 520 nm 투과용 bandpass filter(XB88/25R)는 Omega Optical(Vermont, 미국)의 것을 사용하였으며 대물렌즈는 Olympus(일본)의 S Plan(20X, N.A. = 0.46)을 사용하였다.

다. Motorized chip-mounting stage

칩 구동용 스테이지 제작에는 현미경용 수동 재물대(SE mechanical stage, Nikon, 일본)와 수동 스테이지(STS-X, 남일광학기기, 인천)를 수직으로 포개어 고정하고 각각에 5상 스테핑 모터(PK-544 NA, Oriental Motor, 일본)를 flexible coupling으로 연결하였다.

라. Sensor and signal acquisition

미약한 형광 신호의 검출을 위해 일종의 photomultiplier tube인 H-5784-03 photosensor module (Hamamatsu, 일본)을 사용하였다. 전압으로 변환된 출력 신호는 컴퓨터 내장형의 12-bit multifunction analog and digital I/O card (PCL-812PG, Advantech, 대만)을 통해 수집하였다. 스테이지 제어 및 데이터 수집/저장 프로그램은 Borland C++ 3.1 또는 Turbo C++ 4.5로 작성하였다.

4. Array fabrication

E. coli 세포 배양, 형질 전환, DNA 추출, polymerase chain reaction 등의 기본 조작은 표준 방법대로 수행하였다. 염기서열 확인은 automated DNA sequencer (ABI Prism 377, PE Biosystems, 미국)를 이용하였다. Oligonucleotide는 제노텍(대전, 한국)에서 주문 합성하였다.

가. Slide glass의 세척

현미경용 슬라이드 글라스(75 x 25 x 1 mm)는 Marienfeld(독일) 또는 Corning (Cat No. 2948, New York, 미국)의 제품을 다음과 같은 방법으로 pre-cleaning 하여 사용하였다. 증류수 150 ml에 50 g의 NaOH를 완전히 녹인 다음 200 ml의 95% 에탄올을 섞어 주었다. 용액이 탁한 상태인 경우 증류수를 조금씩 가해 저어주면서 투명해지도록 만들어 사용하였다. 이렇게 제조한 cleaning solution에 슬라이드 글라스를 20매 들이 rack에 채워서 담가 놓은 다음 rotary shaker에 2시간 이상 두었다. rack 채로 꺼내어 증류수를 채운 용기에 넣어 3회 이상 헹구어 내고 dry oven에서 완전히 건조시켰다.

나. Plasmid 또는 PCR product의 경우

길이가 긴 DNA의 경우 다음과 같이 슬라이드 표면에 (+)-charged polymer를 도포한 다음 DNA를 스포팅하여 정전 결합을 시켜 사용하였다. 세척한 슬라이드 글라스를 20매 들이 rack에 꽂은 다음 4배 부피의 증류수로 희석한 poly-L-lysine 용액 (P8920, Sigma)에 1시간 동안 정치하였다. rack을 원심분리기기에 넣고 돌려서 여분의 용액을 털어 제거한 뒤 밀폐되지 않은 상자에 수일간 보관하여 완전히 건조되도록 하였다.

준비한 DNA는 3X SSC에 적절한 농도가 되도록 녹인 다음 polystyrene round-bottom 96-well plate (Cat No. 262170, Nunc, IL, USA)에 담아서 poly-L-lysine을 처리한 슬라이드 글라스 위에 microarrayer robot로 스포팅 하였다. 각각의 array는 끓는 물위에 잠시 두어 hydration 시킨 다음 100°C의 hot

plate에 3초간 얹어서 말린 뒤 UV-crosslinker (60 mJ)에 넣어서 cross-linking 이 일어나게 하였다. Hybridization시 background binding을 줄이기 위해 DNA 와 결합하지 않고 남아있는 lysine 잔기를 다음 방법과 같이 block하였다. 315 ml의 n-methyl-pyrrolidinone(Aldrich)에 5 g의 succinic anhydride (Aldrich)를 완전히 녹인 다음 0.2 M sodium borate buffer (ph 8.0) 35 ml를 섞은 용액에 array를 15분간 담가서 흔들어 주었다. 이를 95°C 수조에 2분간 담가 double-stranded DNA를 denaturation 시킨 뒤 즉시 95% 에탄올에 1분간 넣어 둔 다음 원심 분리하여 여분의 액체를 제거하였다.

다. Oligonucleotide의 경우

Modified oligonucleotide의 고정법은 Guo 등의 방법을 이용하였다¹⁵⁾. 미리 세척한 슬라이드 글라스를 95%의 아세톤/물 용매에 1%로 녹인 3-aminopropyltrimethoxysilane (Aldrich)에 2분간 담근 뒤 꺼내어 아세톤으로 5 회 세척하여 말린 다음 10% pyridine/formamide 용매에 0.2%로 녹인 1,4-phenylene diisothiocyanate(PDC, Aldrich) 용액에 2시간 동안 담가 두었다. 반응이 끝난 뒤 슬라이드를 메탄올과 아세톤으로 씻어 준 뒤 사용하기 전까지 4°C의 vacuum desiccator에 보관하였다.

Cruachem의 aminolinker column을 써서 제조한 3'-NH₂ oligomer를 0.1 M sodium carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.0)에 0.1 - 2 mM로 녹인 다음, PDC를 처리한 슬라이드에 1 μl씩 마이크로피펫으로 스포팅하여 37°C의 humidified chamber에 두었다. 약 2시간이 경과한 후 1% 암모니아수로 1회, 증류수로 3회 씻어서 실온에서 건조시켰다.

5. Fluorescent labeling

올리고머의 5'-fluorescein labeling은 Promega의 FluoroAmp T4 kinase green oligonucleotide labeling system(F1680, 1999년 현재 생산 중단) 또는 Amersham Pharmacia Biotech의 5'-oligolabelling for fluorescence kit(RPN 5755)를 사용하였다. 기본 원리는 다음과 같다. Adenosine-γ-thiotriphosphate와 T4 polynucleotide kinase를 사용하여 올리고머의 5'-OH에 thiophosphorylation을 일으킨 다음 maleimide-fluorescein을 반응시킨 뒤 Sephadex G-50 desalting column으로 fluorescein이 표지된 올리고머를 분리한다. 올리고머 1 분자에 대한 fluorescein의 치환 정도 (DOS, degree of substitution)는 다음과 같은 방법으로 계산하였다¹⁶⁾.

$$D.O.S. = \frac{\frac{10,000N}{65,000} \times A494}{A260 - (0.35 \times A494)}$$

6. Hybridization and detection

Hybridization에는 듀랄루민으로 자체 제작한 전용 chamber를 사용하였다. 형광

으로 표지한 시료 DNA는 정제하여 10 μl 의 4X SSC에 녹이고 10% SDS를 0.2 μl 섞은 다음 2분간 끓인 다음 얼음에 꽂아서 10초간 급랭한다. Array 위에 8 - 12 μl 가량의 형광으로 표지한 시료 용액을 올려놓고 18 x 18 mm의 커버 글라스를 덮은 다음 마르지 않도록 물을 약간 넣은 hybridization chamber에 넣고 뚜껑을 덮어 클램프로 고정하여 항온 수조에 넣었다. Plasmid-based array인 경우에는 42°C에서 3시간 동안 hybridization 한 다음 실온에서 0.2% SDS가 포함된 4X SSC로 씻어내었다. Array를 판독하여 얻은 바이너리 파일은 영상 분석 소프트웨어인 Scion Image로 분석하였다.

[연구 결과 및 고찰]

1. 혈중 단백질 정량을 위한 면역 전극 제작

가. 면역 전극의 기본 구성과 cyclic voltammetry

기본적으로는 기존의 면역분석방법인 ELISA의 원리를 이용하되 그림 3-1-1과 같이 효소 활성을 전기적으로 검출하도록 하였다. 즉 분석하고자 하는 단백질(항원)에 특이적으로 결합하는 항체를 전극 표면에 고정화한 다음 시료 용액에 넣어서 전극 표면에서 항원-항체간 결합을 일으킨다. 이를 세정하여 산화환원효소-항체 결합체 (conjugate)가 들어있는 용액에 넣어 전극표면에 결합한 측정대상물질에 2차 항체가 결합하도록 한다. 다시 이를 세정하여 산화/환원 mediator가 들어있는 반응액에 넣고 기준 전극 대비로 mediator의 환원을 일으킬 수 있는 전압을 인가한 다음 기질(과산화수소)을 첨가한 후 효소반응으로 생성된 oxidized mediator가 전극 표면에서 재환원될 때 발생하는 전류의 시간적 변화를 측정하는 chronoamperometry 방식을 선택하였다.

우선 전극상에서 일어나는 mediator의 가역적 산화-환원 양상을 cyclic voltammetry로 관찰하였다. Glassy carbon electrode과 ferrocenemonocarboxylic acid(FMCA)를 조합하였을 때 가장 이상적인 곡선을 얻을 수 있었다 (그림 3-1-2). 면역 전극에서 사용하게 될 효소인 peroxidase는 여러 가지의 electron donor로부터 전자를 빼앗아 과산화수소(H_2O_2)를 물로 환원시킨다. 따라서 mediator는 이 효소반응의 electron donor 역할을 하게 되며 산화된 mediator가 즉시 전극에서 환원되도록 E'보다 negative의 전압(Ag/AgCl 표준전극 대비 0.0 V)을 인가해 주었으며 scan rate는 20 mV/sec로 하였다.

나. Horseradish peroxidase(HRP)의 활성 측정

HRP(EC 1.11.1.7)은 Sigma사의 제품(P-8000)을 이용하였으며 일반적인 활성은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)를 산화시킬 때 생성되는 반응물의 흡광도를 405 nm에서 측정하여 평가하였다. 수용액중 HRP의 농도는 403 nm의 몰 흡광계수가 9.1×10^4 임을 이용하여 결정하였다.

반응액 내에 mediator만 존재할 경우에는 voltage sweeping을 함에 따라 전극에서 mediator가 가역적으로 산화/환원하면서 대칭적인 voltammogram을 보이지만 HRP의 효소 반응이 공존할 경우에는 효소에 의해 지속적으로 mediator가 산화되며

로 환원전류 peak가 훨씬 커지고 반대로 산화전류는 감소하게 된다. 2.6 uM HRP, 0.6 mM FMCA(mediator), 17.6 mM H₂O₂의 조건에서 0.0 V - 0.35 V 구간으로 cyclic voltammetry를 한 결과 환원전류가 훨씬 증가함을 확인하였다. 그런데 여러 번 scan을 반복함에 따라 환원 전류의 최대치가 점차 감소함을 보였는데 이는 과산화수소의 소모에 기인한 것으로 보인다.

다. Chronoamperometry에 의한 수용액중의 HRP 활성 측정

정량의 mediator와 반응기질(과산화수소) 존재 조건에서 얻어지는 시간에 따른 환원전류의 변화 양상은 반응액 내의 HRP양에 관계함을 이용하여 HRP를 정량할 수 있다. Cyclic voltammetry에서와는 달리 전극표면에서 mediator의 고갈이 일어나지 않도록 용액을 stirring해 주었다. 0.06 ug - 3 ug의 HRP를 넣은 상태에서 약 15분간 환원 전류를 측정된 결과 HRP의 양에 대략적으로 비례하여 slope가 증가함을 알 수 있었다(그림 3-1-3).

라. 발색법과 전기화학식 검출에 의한 HRP 활성 측정의 비교

전기화학식 면역 바이오센서가 실제로 활용되려면 기존의 방법과 비교했을 때 편의성 뿐 아니라 검출한계(sensitivity) 역시 우수해야 한다. 비교 실험으로서 96-well plate에 연속 희석한 미량의 HRP를 넣고 발색기질(ABTS)을 섞은 뒤 microplate reader로 각 well의 OD_{405nm}를 측정된 결과 5 ng까지의 HRP를 정량할 수 있었다. 그러나 전기화학적으로 측정할 경우에는 앞에서 기술하였듯이 최소한 0.1 ug(=100 ng) 정도의 HRP가 존재해야 potentiostat로 측정이 가능하였는데 이는 발색법에 비해 약 20배나 되는 양이다. 그리고 효소를 전극표면에 고정할 경우 유효한 효소량은 더욱 감소한다는 문제가 있다. 현재 보고되고 있는 면역 바이오센서의 성능을 보면 수분동안의 전류변화량이 겨우 수십 nA에 해당하여 검출한도가 매우 낮은 potentiostat를 쓰지 않는 이상 실용성에는 문제가 있다고 본다.

2. Microarrayer의 제작

가. Printing pin

미량의 액체를 슬라이드 글라스 위에 올려놓는 방법은 열, 솔레노이드 액츄에이터 또는 piezoelectric 소자 등을 사용하여 유리 표면을 직접 접촉하지 않고 용액을 분사하는 비접촉식 방법과, 끝이 뾰족한 핀 형태의 물체에 용액을 묻힌 뒤 직접 유리판에 스포팅하는 접촉식 방법이 있다. 전자의 경우는 기술적으로는 더 앞서 있으며 분사되는 용액의 양을 원하는 대로 조절이 가능하다는 장점이 있다. 그러나 실험실 수준에서 단기간에 prototype의 형태로 구현해 내기가 어려우며, 적은 종류의 시료를 여러 장의 슬라이드에 찍는 데는 적합하지만 cDNA expression array와 같이 대단히 많은 종류의 시료를 나누어 찍는 경우에는 각 노즐마다 별도의 카트리지(시료의 reservoir)를 달아주거나 교체하기가 어렵다는 단점이 있다. 잉크젯 프린팅처럼 분사할 모든 종류의 시료 용액을 프린팅 헤드 어셈블리에 항상 장착하고 있는 것이 아니라, multi-well plate에 담긴 시료를 빨아

들여서 인쇄를 마치고, 세척 뒤 다음 번 시료를 loading하는 시스템으로 설계를 할 수도 있지만 폐쇄적인 수밖에 없는 구조 특성상 원활한 세척이 힘들고 loading을 위한 별도의 구동 방안을 마련해야 하며 air bubble이 생겨 문제가 발생할 수도 있다. 따라서 원리적으로 가장 간단하고 구현하기 쉬운 접촉식 핀 방식을 택하였다.

접촉식 핀에는 단순한 바늘 모양의 solid pin과 끝에 만년필 촉과 같이 좁은 홈을 가공한 "split or quill" pin이 있다(그림 3-1-4). Solid pin은 colony picker등에서 쓰이던 형태인데 일정량을 찍기 어렵고 pin에 묻어있는 양이 적기 때문에 매번 슬라이드에 찍을 때마다 loading을 새로 해야 한다. 본 연구에서는 스탠포드대의 Brown Lab에서 널리 대중화시킨 split type의 pin을 가공하여 사용하였다. 처음에는 국내의 와이어 커팅 업체에 직경 3밀리미터의 스테인리스 스틸 봉을 가공토록 하였으나 국내에 보급된 가공 장비는 사용하는 와이어의 최소 굵기가 0.1 mm나 되어 spot의 직경이 너무 커지고, 핀 끝의 정 중앙에 slot이 정확히 위치하도록 정밀하게 제작하지 못하는 문제점이 있었다. 따라서 이러한 타입의 핀을 계속 제작 공급해 온 미국의 Majer precision에 주문하여 사용하였다. 재질은 308L 스테인리스 스틸이고 slot의 폭은 0.001 인치 (= 25 마이크론)이었다.

나. Printing pin assembly

핀 헤드는 듀랄루민을 재료로 사용하여 중심간 간격이 9 mm인 2 x 2 배열의 핀 4개를 수용하도록 제작하였다. 이것은 96-well plate의 인접한 4개 well에서 동시에 시료 용액을 loading 할 수 있게 하기 위한 것이다. loading과 spotting 시 핀의 끝이 바닥 면에 접촉하게 되므로 핀을 완전히 고정해서는 안되고, 헤드에 대해서 핀이 윗방향으로 자연스럽게 밀려 올라가지만 중력에 의해 빠지지는 않도록 중간에 스프링을 삽입하였다. 일부 시판되는 프린팅 핀 헤드에서는 수직 구멍에 단순히 핀을 삽입해 놓고 중력에 의해 걸쳐져 있도록 하는 경우가 많은데 구멍을 매우 정밀하게 가공해야 하고 계속적인 사용에 따른 마모의 가능성이 있다. 그러나 XY 평면상에서 핀이 정확한 위치에 유지되고 또한 헤드와 핀간의 마찰을 최소한도로 줄이기 위해 ball bush를 통해 핀을 삽입시켰다(그림 3-1-5). 이 경우에는 spotting 동작에서 밀려 올라간 핀이 중력만으로 다시 원위치로 돌아오지 않으므로 10 - 20 gf/mm 정도의 스프링을 사용하여 preload를 주었다.

다. Printing characteristics

접촉식 스포팅 방식을 이용할 경우 유리판 위에 놓이는 용액의 용량은 다음과 같은 여러 요인에 의해 결정된다.

- 핀의 이동 속도
- 용액의 성질
- 핀 및 유리판 표면의 성질

예를 들어 아무 처리를 하지 않은 유리판에 비해 폴리머를 도포하여 hydrophobic하게 만든 표면에는 더 적은 양의 용액이 찍힌다. 따라서 최적의 스포

팅 조건은 실험적으로 결정할 수밖에 없다. 0.025 mm slot의 핀으로 0.1 M carbonate buffer를 poly-L-lysine 슬라이드에 인쇄하는 테스트 실험을 통하여 다음과 같은 조건을 정립하였다.

- 유리판 면에 대해 -1.5 mm 정도 위치를 목표 위치로 함
- 핀의 하강 속도: 50 mm/sec
- 목표 위치(최 하단)에서 머무르는 시간: 0.1초
- 핀의 상승 속도: 50 mm/sec

slot의 폭이 넓은 핀은 loading 직후 meniscus가 위쪽으로 치우쳐서 맺히는 수가 많아 스포팅이 잘 되지 않는 경우가 종종 발생하였다. 또한 핀을 시료 용액에 단순히 담그는 것만으로는 loading이 잘 되지 않아서 핀 어셈블리를 수평방향으로 잠시 요동하도록 motion parameter를 조정해 보기도 하였으나, Majer Precision의 핀으로 대체함으로써 이러한 문제는 대부분 해결되었다. 그림 3-1-6은 25 마이크론 slot의 핀을 써서 PDC slide에 시험적으로 잉크를 찍어 본 결과이다.

라. Motion control system

브러쉬리스 DC 모터와 linear guide 및 정밀 ball screw의 직선운동 시스템 3조로 구성된 3축 직교 좌표 로봇을 광학 정반위에 고정하였다(그림 3-1-7). 작업 영역위에 돌출 되어 있는 세척 장비들에 닿지 않도록 하기 위해서 두께 15 mm의 강판으로 만든 받침 블록(높이 130 mm)위에 로봇을 고정시켰다. 본 장치에서 사용한 직교 로봇은 3개의 축이 직각으로 모두 한 데 고정된 소위 “외팔보(cantilever)” 형식으로 공간 활용성이 좋고 작업 플레이트를 별도로 가공할 필요가 없는 장점이 있지만 스탠포드 대학의 microarray와 같은 gate 형태에 비해서는 진동면에서 다소 취약할 수 있다(그림 3-1-8). 그러나 최소 0.1 - 0.15 mm 간격의 점을 찍는 용도를 위해서는 크게 문제 될 것이 없다고 본다. 테이블 위에 직접 고정되는 X축에 평행하게 직동 레일을 추가 장착한 다음 현재 지지되지 않는 부분인 Y축 말단을 고정하여 더욱 견고하게 작동하도록 할 계획이다.

FARAMAN robot은 정밀급 (GE 15-20)의 볼스크류로 작동되며 lead (모터 1회전에 이동하는 직선거리)는 X, Y축이 20 mm, Z축은 10 mm이다. 서보모터의 검출기 (엔코더)는 2048 펄스/회전급이므로 위치제어 펄스 하나당 9.8 μ m 단위의 위치 결정 운전을 할 수 있다. 제조사 측에서 제시한 위치 결정 정도는 +/- 30 μ m 수준으로서 연구목적의 고밀도 microarray를 인쇄하는데는 지장이 없을 것으로 판단된다.

마. 인쇄용 핀의 세척/건조 장치

매번의 printing cycle마다 시료의 carry-over를 최소화하기 위하여 핀을 세척해야만 한다. 본 연구에서 제작된 microarray에서는 초음파 세척기, running water basin(그림 3-1-9), 그리고 진공 펌프를 이용한 건조대를 장착하고 있다. 실제 microarray의 작동 사이클을 그림 3-1-10에 나타내었다.

3. Chip Scanner의 제작

가. 형광 염료와 광원의 선정

시료 DNA를 형광 표지하는 방법에는 형광 물질이 화학적으로 결합되어 있는 nucleotide를 이용하거나 또는 효소적 방법으로 올리고머의 5'-말단에 형광 분자를 결합시킨 뒤 이를 프라이머로 하여 PCR을 수행하는 방법이 있다. 전자의 방법을 사용하는 경우 단위 DNA target당 들어가는 형광 물질의 양은 더 많으나, 일반적으로 프라이머를 한번 반응시켜 표지하는 경우에는 100회 이상의 PCR에 사용할 수 있는 양의 프라이머를 만들 수가 있기 때문에 경제성 측면에서는 후자가 더 유리하다.

본 연구에서는 가장 대중적인 형광물질의 하나인 fluorescein을 선택하였다. 이 물질의 최적 excitation 파장은 아르곤-이온 레이저의 488 nm와 매우 가깝기 때문에 confocal laser scanning microscopy나 flow cytometry에서 널리 쓰이고 있으며 가격도 매우 저렴한 편이다. 그러나 오랫동안 사용되어 온 만큼 단점도 많이 알려져 있는데, 1) pH 7.0 이하에서는 형광이 감소하고(pKa ~6.4) 2) 비교적 photobleaching이 잘 되며, 3) 생체 고분자에 결합한 상태에서는 quenching의 경향이 있으며, 4) emission spectrum이 넓은 편 등이다. 그러나 최대 excitation 파장이 아르곤 이온 레이저의 488 nm line에 일치하고 fluorescein의 단점들을 보완한 새로운 형광물질도 개발되어 시판되고 있다.

아르곤-이온 레이저는 기본적으로 자외선 영역에서 528.7 nm 까지 여러 파장의 빛을 내며, 이중에서 514.5 nm와 488 nm의 line이 가장 광도가 높다. KAIST microarray scanner에서는 10 mW급의 488 nm 단일 파장을 만들어내는 공랭식 제품을 구입하여 사용하였다. 냉각 팬의 진동이 장치로 전달되는 것을 피하기 위해서 레이저 헤드와 냉각 팬이 일체로 되어있지 않고 유연한 튜브로 연결되어 있는 제품을 선택하였다. 예비 실험 과정에서 예상과는 달리 488 nm를 99% 이상 반사시키는 dichroic beamsplitter를 통과한 빛이 검출되었는데 이는 레이저 출력부에 488 nm만을 통과시키는 bandpass filter를 삽입하여 해결할 수 있었다. 단파장 레이저라고는 하지만 가장 높은 출력의 514.5 nm line이 적은 출력이나마 섞여 있는 때문으로 풀이된다.

사용한 레이저 헤드(2214-10SL, Uniphase, USA)는 전원 공급장치에서 전류를 변화시킴으로써 출력을 조절할 수 있는데, 최소 5 mW - 40 mW 이상의 출력을 낼 수 있으며 light control mode로 작동할 경우 fluctuation이 1% (RMS, 20 - 2 MHz)정도로 매우 안정한 출력을 낸다. 시판되는 대부분의 microarray reader가 출력 10 mW 내외의 레이저를 장착하고 있으므로 본 제품으로 충분하다고 본다.

나. Intermediate optical system

Microarray scanner는 광학 구성이 기본적으로 confocal laser scanning microscopy와 유사하다(그림 3-1-11). Koeller 조명법을 쓰는 일반적인 wide-field epifluorescence microscope에서는 광원의 이미지가 시료 평면상에는 맺히지 않는 형태이나, 이 시스템에서는 칩 상에 excitation용 레이저 빔을 직접 포커싱 한다는 점이 다르다. 입사광과 형광을 파장의 차이를 이용하여 구분하기

위해 광학 필터를 사용하게 되는데, 보통 한 종류의 광원과 형광 염료에 쓰일 수 있는 필터 블록을 여러 개 준비해 놓고 필요에 따라 선택을 하여 쓰는 것이 보통이다. 필터 블록은 1) 광원에서 형광 물질에 적합한 파장만을 통과시키는 excitation filter, 2) 입사광은 반사시켜 렌즈 쪽으로 보내고 되돌아오는 형광은 통과시키는 dichroic beamsplitter, 3) 검출기까지 따라온 excitation light를 제거하기 위한 emission filter의 조합으로 이루어진다. 본 연구에서는 기성품의 필터 블록 대신 직경 1인치의 필터를 개별적으로 입수하여 optical breadboard 위에 조립하여 사용하였다.

현재로서는 한가지 형광 물질만을 검출할 수 있는 단파장 광원/필터 시스템을 제작 완료한 상태이나, multiplex analysis를 위해 동시에 두 가지의 형광물질을 검출할 수 있도록 개선을 할 예정이다. 두 종류의 형광 염료를 동시에 검출하는 방법으로는 필터 블록을 바꾸어 가면서 각각 스캐닝을 하는 방법이 가장 간단하고 신호의 손실도 적지만 필터를 교체하는 과정에서 광로가 약간이라도 어긋나게 되면 결과 이미지를 중첩 (superimpose) 할 때 shift error가 발생하게 된다. 이에 대한 대안으로 multi-band filter set를 사용하면 가동 부품이 최소화되므로 오차 없는 상을 얻을 수 있다. 현재의 계획은 fluorescein isothiocyanate (FITC), Cy3 및 Cy5의 3가지 형광물질을 동시에 검출 가능한 필터 블록을 장착하고 추가 광원으로서 Cy5를 excitation 할 수 있는 5 mW 급의 He-Ne laser를 설치하는 것이다. 그러나 검출기인 photomultiplier tube (PMT)를 하나만 사용하는 관계로 multi-band filter를 사용한다고 해도 스캐닝은 2회 실시해야 한다. 제 2의 dichroic beamsplitter를 설치하여 형광 신호를 파장별로 다시 나눈 다음 별도의 검출기로 보내는 방식은 스캐닝 1회에 두 종류의 형광물질을 모두 인식할 수 있으므로 진정한 의미의 multiplex analysis가 가능하지만 PMT를 2개 사용해야 하므로 추가 비용이 든다.

칩 표면에 레이저 빔이 포커싱 된 정도를 모니터하기 위하여 검출기의 직전에 45도 각도로 wedged window를 넣어 빔살의 일부를 반사시켜 CCD 카메라로 향하게 하였다(그림 3-1-12, 3-1-13). Dichroic beamsplitter를 통과한 형광의 포커싱을 위한 plano-convex lens의 위치를 정밀하게 조정하여 CCD 면에 선명한상이 맺히도록 하였다. 칩 표면에서 반사된 레이저 빛 중에서 dichroic beamsplitter를 통과한 약한 빛을 사용하기 때문에 감쇄기를 삽입하지 않아도 레이저의 초점 형태를 선명하게 구별할 수 있었다. 그림 3-1-14는 칩 고정 부위의 상세도이다.

다. 검출 장치

형광 검출 시스템에서 가장 널리 쓰이고 민감도가 높은 광 검출기인 photo multiplier tube (PMT)를 사용하였다. 일반적으로 PMT는 고압 전원 공급장치를 포함하여 가격이 높은 편인데, 필수 액세서리를 하나의 금속 패키지에 넣은 소형, 저가의 module 형태의 것을 사용하였다. PMT의 민감도는 일련의 dynode에 공급하는 전압에 따라 지수적으로 높아지는데, 보통 1000 V 정도에서 작동을 시키게 된다. 본 연구에서 사용한 부품은 고전압 발생장치가 내장되어 있어서 외부에서는 +/-15 V만 공급해 주면 되며, potentiometer로 0 - 1 V control voltage를 입력해 주면서 민감도를 조절할 수 있게 되어 있다. 또한 amplifier를 내장하고 있어서 PMT의 신호 전류를 전압으로 전환해 주므로 간편하게 analog input card에 직결

하도록 되어 있다. 소형으로 만든 대신 표준적인 28 mm 직경의 PMT에 비해 민감도가 크게는 20배 정도 차이가 나지만, 공급 전압을 상향 조정하고 analog input card의 이득을 조절하는 것으로 충분하다고 판단된다.

라. Chip mounting stage

칩 전체를 고르게 조명하는 것이 가능하다면 형광 이미지를 CCD camera로 한번에 받아들여 결과를 얻게 할 수도 있다(그림 3-1-15). 일부 시판되는 칩 스캐너에서는 형광 현미경에서 사용하는 아크 램프를 광원으로 하여 칩을 비스듬히 조명해 주고 array의 형광 패턴을 CCD camera로 촬영하는 시스템을 갖추고 있다. 그러나 이러한 방법의 단점은 1) CCD의 민감도가 PMT보다는 떨어지기 때문에 장시간 노출을 해야 하지만 이런 용도에 적합한 low-noise, cooled CCD는 대단히 값이 비싸고 2) 모든 방향으로 퍼지는 형광의 특성상 넓은 각도에서 나오는 빛을 수용할 수 있는 렌즈(개구수가 높은 렌즈)를 쓰는 것이 절대적으로 유리하나 현미경용의 대물렌즈와는 달리 개구수가 최대 0.4 정도가 실질적인 한계라는 점이다. Confocal illumination은 칩과 focusing laser beam간의 상대적인 운동이 일어나야 비로소 2차원 영상을 얻을 수 있기에 기구적으로는 약간 복잡하고 판독 시간이 길어지기는 하나 현 기술상태에서는 가장 효과적인 방법이라고 할 수 있다.

Confocal microscope에서는 스캐닝을 할 범위가 매우 작기 때문에 galvanometer 라는 일종의 회전 거울을 써서 beam 자체를 상하좌우로 움직여주는 방법을 쓰지만, DNA chip scanner는 읽어야 할 부분의 면적이 cm 단위로 매우 크기 때문에 다른 방안을 강구해야만 한다. 가장 간단한 방법은 칩을 고정된 스테이지를 주사선 형태로 움직이는 것인데 일반적인 연구용 전동 스테이지는 값이 매우 비싸고 최고 속도 역시 초당 수 cm로 느린 편이어서 현미경의 수동 스테이지를 개조하여 5상 스테핑 모터를 달아 구동하였다. 이 단계에서 고려해야 할 점은 스테이지의 직진 주행 성능, 속도, 그리고 위치 정보에 대한 feedback이다. 마지막 사항은 스캐너의 resolution을 직접적으로 결정하는 요인이므로 매우 중요하다. 이는 결국 칩의 이미지를 몇 마이크론 짜리 화소(pixel)로 나타낼 것인가에 대한 문제이다. 국내에서 제작한 인쇄용 핀(slot 폭은 0.1 mm)을 사용하여 인쇄한 microarray를 예로 들면 한 spot의 직경이 약 0.2 - 0.3 mm 정도이므로, 여기서부터 나오는 형광 이미지를 정확히 표현하려면 픽셀의 크기가 20 마이크론 미만이어야 할 것이다. X-stage로 개조한 현미경용 스테이지의 경우 rack and pinion 방식으로 구동되며 축 1회전에 대해 18 mm를 움직이는데, 이를 구동하는데 쓰이는 5상 스테핑 모터는 1회전을 1000분할 할 수 있으므로 모터에 공급되는 구동 펄스를 데이터 획득용의 트리거 펄스로 사용하여 18 마이크론의 해상도를 얻을 수 있었다(그림 3-1-16). 실제로는 구동 펄스와 모터의 회전이 완전히 동기하지 않을 수 있으므로, 모터 축에 인코더를 달아서 사용하면 더 성능을 개선될 것이라 본다. 직선 운동을 하는 부분에 리니어 엔코더를 달아서 위치 정보를 얻는 것이 가장 완벽한 방법이지만 비용 측면에서 매우 비싸기 때문에 이를 고려하지는 않았다. Y-stage는 픽셀 단위로만 움직이고 고속을 낼 필요가 없으므로, 마이크로미터(리드 0.5 mm)로 움직이는 수동 스테이지에 5상 스테핑 모터를 달아 사용하였다. X-stage는 microarray의 모터 콘트롤에 사용중인 MMC card에서 쓰

이지 않고 있는 제 4번 축에 연결하여 구동하였으며 Y-stage는 운전 중에 필요로 하는 펄스의 수가 많지 않은 관계로 구동 프로그램 상에서 간단히 펄스열을 출력하여 움직이도록 하였다.

실제로 슬라이드 글라스에 적당한 패턴을 그린 다음 스캐닝 해 본 결과 전체적인 성능이나 속도에는 큰 문제가 없었으나 백래쉬에 의해 매 row가 정확히 일치하지 않는 현상이 나타났다. 이것은 rack and pinion 방식의 직선 운동 시스템이 갖는 필연적인 문제로 생각되는데, 한 방향으로 진행할 때만 데이터 수집을 하게 함으로써 이 현상을 없앨 수 있었다.

칩 스테이지의 구동 방법은 본 연구에서 제작한 칩 판독기 전체에서 가장 정밀도를 요하면서 개선의 여지도 많은 부분에 해당한다. 현재까지는 상용화되어 있는 부품을 최대한 활용하여 전동 스테이지를 제작, 기초적인 데이터들을 얻었으나, 성능 개선을 위해 모터(AC 서보 모터)와 정밀 기계요소를 사용한 XY stage를 제작하고 있다. 시판되는 스캐너의 성능 사양을 보면 대부분 최소 10 마이크로 픽셀의 해상도를 내면서 5 - 10분 이내에 판독이 완료된다. 볼 스크류나 랙/피니언을 사용한 반복 직선 운동은 기본적으로 속도를 높이는데 한계가 있으므로, 궁극적으로는 새로운 개념의 스캐닝 방식이 고안되어야 할 것이다.

마. Data acquisition and analysis

PMT로부터 나온 신호 전압은 low-pass RC filter ($f_c = 10.6 \text{ kHz}$)를 거쳐 다용도 데이터 수집 카드인 Advantech PCL-812PG의 아날로그 입력 단자에 연결하였다. 트리거는 구동부의 X-stage 운전용 펄스를 사용하도록 하되 양방향 스캔이 가능하도록 CW 및 CCW 펄스 출력 단자를 7432 OR 게이트에 입력시켜 사용하였다. 데이터 트랜스퍼는 컴퓨터의 IRQ를 사용하여 고속으로 background에서 일어나도록 하였다. 최초로 개발된 작동 프로그램은 Borland C++ 3.1 for DOS 환경에서 제작되었으며 스캐닝 속도 및 범위, programmable gain을 조절할 수 있고 데이터를 최대 12비트의 정수 (0 - 4095)로 전환하여 이진 형태로 출력 파일에 기록시키는 역할을 한다. 결과 파일은 Scion Image 프로그램에서 import 하여 2차원 영상으로 전환시켜 분석하였다. PCL-812PG는 bipolar 입력만을 받아들일 수 있어 있으나 PMT는 실제적으로 (+) 값만을 출력하므로 데이터 디스플레이시 최소값을 적절히 설정하여야 한다. 별도의 프로그램을 사용하지 않고 윈도우즈 환경에서 스테이지의 구동, 데이터 획득 및 2차원 영상으로 디스플레이까지 가능한 프로그램을 개발하고 시험 작동하고 있다.

4. Array 제작 및 형광 신호 검출

가. PDC slide를 이용한 아민 수식 oligonucleotide의 고정

(1) Oligonucleotide의 선정 및 합성

3'- 말단이 NH_2 - 잔기로 수식된 oligonucleotide는 apoE 유전자의 다형 진단용으로 제노텍(대전, 한국)에서 개발한 것 4종(24 - 25mer)을 입수하여 사용하였다. apoE 유전자는 혈장 지단백중 초저비중지단백(VLDL), 고비중지단백

(HDL), 유리지립(chylomicron) 및 유리지립잔유물(chylomycron remnants)의 중요한 구성단백인 아포리포단백질 E의 유전자로서 apo E2, E3, 및 E4의 3가지 isotype이 존재하며, 발현 유형에 따라 hyperlipoproteinemia, hyperlipidemia, 심혈관 질환 등과 연관이 있는 것으로 알려져 있어 정확한 isoform의 진단이 매우 중요한 유전자이다. 아민 수식이 되어 있지 않은 대조군 올리고머는 T7 프로모터 부위에 해당하는 23 mer (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3')을 합성하여 사용하였다.

(2) 고정 수율의 확인

형광 표지용 키트를 이용하여 apoE 및 T7 올리고머의 5'-OH에 fluorescein 을 도입한 형광 올리고머를 만들어 정제한 다음 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.0)에 10 - 100 pmol/ μ l 수준으로 녹인 다음 1 μ l씩을 PDC 처리 슬라이드 글라스에 마이크로피펫으로 찍은 다음 상기의 방법대로 고정하여 스캐닝 하였다. 스캐닝의 정상적인 조건은 레이저 출력 6 mW, 아날로그 신호 입력의 게인 설정은 16배로 하였다. 그림 3-1-17 (A)의 결과에서는 같은 농도의 올리고머를 사용하였을 경우 T7 올리고머에 비하여 아민 수식 올리고머가 약 2배 정도 더 많이 결합했음을 보여주고 있다. 그러나 여러 회 반복 실험을 하였지만 대조군에 비해 월등히 고정 효율이 높음을 확인할 수는 없었으며, 올리고머의 고정에 대한 기존 방법의 최적화 및 새로운 immobilization chemistry의 개발이 매우 절실하다고 본다.

(3) Oligo-based array의 hybridization 효율에 관한 고찰

불투성의 고상 지지체 (nonpermeable rigid support)에 고정된 올리고머와 용액상의 DNA 분자간 hybridization이 일어나서 염기서열 특이적인 duplex를 형성하는 효율은 온도나 염기서열과 조성, 반응액중의 salt 농도 등의 조건과 더불어 지지체에 각 올리고머들이 어떠한 형상으로 고정되어 있는지 에도 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 특수하게 처리한 유리판이나 폴리프로필렌 필름 위에 직접 올리고머를 합성해 나가는 경우 올리고머의 밀도가 너무 높아져서 steric crowding이 일어날 정도이지만 ammonia deprotection 과정에서 일부가 탈락한다¹⁷⁾. 그러나 미리 DNA를 합성 또는 증폭하여 spotting하는 방식으로 칩을 제작하는 경우 용액의 농도가 실제적인 제한 요인이 될 수 있다.

지지체와 올리고머를 연결하는 spacer의 길이가 hybridization yield에 매우 중요하다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다¹⁸⁾. Spacer가 길어질수록 yield가 증가하다가 최적 길이를 초과하면 오히려 감소하는데, 이 현상은 올리고머가 spacer 속으로 다시 묻히기 때문으로 풀이할 수 있다. 본 연구에서 활용한 올리고머의 고정법에 따르면 silane과 PDC로 이루어진 23-atom의 링커 외에도 최소한 6개의 d(T)가 존재해야만 hybridization signal이 나왔던 것으로 보고하였다. 그러나 20-atom의 링커로 충분하다는 견해도 있다¹⁾.

Differential expression을 연구하는데 쓰이는 cDNA chip의 경우는 array를 이루는 DNA의 길이가 길기 때문에 실제적인 Tm의 차이가 많지 않아서 칩 전체

1. Mark Schena, personal communication.

를 같은 조건(염 농도, 온도)에서 hybridization하고 wash하는데 별다른 문제는 없다. 그러나 올리고머 array는 각 개별적인 oligomer들의 T_m이 조금씩 다르기 때문에 되도록 T_m이 유사한 범위안에 들어오도록 칩 설계단계에서 배려를 해야 한다. 특히 유전자 변이/다형을 진단하기 위한 칩은 한 염기열의 차이에 의한 helix destabilization effect가 최대화하도록 hybridization 및 wash 조건을 확립하는 것이 관건이나 아직 이론만으로 hybridization 현상을 설명하고 결과를 예측하는 것은 매우 어려운 과제이다.

나. cDNA array의 제작

pUC19 벡터에 클로닝한 사람의 안티트롬빈 cDNA와 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 apoE3 유전자를 대장균에 도입, 분리 정제한 뒤 3X SSC에 녹여 0.2 μM, 40 nM 및 8 nM의 용액을 만든 다음 microarray를 이용하여 각 클론당 10 X 3 array를 제작하였다. Fluorescein으로 표지한 apoE 3 올리고머(50 nM in 4X SSC, 0.5% SDS)를 써서 42°C에서 3시간 동안 hybridization 한 뒤 실온에서 0.2%의 SDS가 함유된 4X SSC로 1회 씻은 다음 스캐닝 하였을 때 가장 농도가 높은 plasmid 용액으로 찍은 spot에 해당하는 곳에서만 형광 신호가 나왔으나 hybridization 및 washing 조건이 최적화 되지 않아서 고정화된 두 종류의 DNA 모두에서 nonspecific binding에 의한 형광 신호가 검출되었다(그림 3-1-17(B)).

다. Scanner의 개선 사항

0.49 mm 간격으로 찍은 fluorescein-oligomer의 microarray를 스캐닝한 결과를 그림 3-1-18에 나타내었다. 외견상 각 spot 들은 균등한 간격으로 찍혀 있지만 스캐닝을 하여 얻은 영상에는 X 축 방향의 간격이 일정하지 않게 나타나 있다. 이러한 현상은 A/D conversion을 지령하는 트리거 펄스(스테핑 모터 구동 펄스를 사용)의 발생 간격이 X-stage가 실제 펄스간 이동하는 거리와 완전히 일치하지 않기 때문이다. 가장 바람직한 방법은 직선운동을 하는 부분에서 직접 위치 정보를 feedback하는 것이지만 이러한 용도의 linear scale은 값이 매우 비싼 편이다. 여기서 사용한 stage는 원래 손으로 조작하게 되어 있는 불완전한 랙-피니언 기구를 채용하고 있다는 것이 한계점이다. 이를 개선하기 위해 리드 4 mm의 정밀급 볼 스크류를 직동 시스템으로 채택하고 리니어 모션 가이드를 달아 직진 주행성을 향상시킨 X-stage를 제작 완료하였다. 볼 스크류를 사용하는 대신 직선 이동 거리당의 모터 회전수가 더 높아야 스캐닝 시간을 줄일 수 있으므로, 스테핑 모터 대신 50 W급 출력의 AC 서보 모터를 장치할 계획이다. 마찬가지로 방법으로 Y-stage도 새로이 제작하였는데 이 방향으로 고속 수행이 불필요하므로 스테핑 모터를 그대로 사용할 계획이다. 특히 X-stage의 구동을 위해 장착할 예정인 서보 모터는 컨트롤러 내장 타입이어서 추가의 PC 형 모터 제어기가 필요 없으며, 회전당 8192단계의 엔코더가 달려 있기 때문에 시판되는 스캐너의 해상도(픽셀당 10 μm)를 능가하는 우수한 성능을 낼 것으로 생각된다.

5. 현 기술상태의 종합적 고찰

Post genome 시대의 새로운 연구기법 platform으로 등장한 DNA chip 기술은 계속적으로 발전 단계에 있다. 기본적으로 microarray 기술은 DNA 분자간의 hybridization에 기반을 두고 있으므로 duplex formation yield의 증대와 단일 염기 열 mismatch에 의한 duplex destabilization 최대화 등 현재의 hybridization 기법이 필수적으로 풀어야 할 문제점들이 그대로 적용된다. 실험 기법 면에서는 DNA 고정 기술의 최적화 및 새로운 지지체의 개발, 형광 검출 방식의 개선책 등이 해결해야 할 과제이며 array format과 데이터 저장 양식의 표준화, 분석 소프트웨어의 최적화, 데이터 베이스의 공유 등 대용량의 array data를 체계적으로 저장하고 분석, 활용하는 방안이 마련되어야 할 것이다.

제 2 절 : LDH, AST, Glucose 측정용 전기화학식 후막형 멀티 바이오센서의 개발

1. 이론적 배경

가. 후막소자기법

본 연구에서 균일한 바이오센서의 대량생산을 위해 이용된 후막소자기법(thick-film technology)은 일정한 패턴을 인쇄한 mesh를 통하여 screen-printing이 가능한 paste를 압착, 통과시키고 이를 후막소자 기판(base substrate)에 접착, 경화시킴으로써 설계한 회로패턴을 얻는 기법을 말한다.¹⁹⁾²⁰⁾ 이와 같이 미소전자회로를 만들기 위한 기술을 이용함으로써 같은 성능을 보이는 바이오센서의 대량생산이 가능하게 되는데,²¹⁾²²⁾²³⁾ 이는 바이오센서의 상용화를 위한 필수적인 요소 중의 하나라고 할 수 있다. 후막소자기법의 기본과정은 paste 제조, printing screen의 design과 제작, printing, drying 또는 sintering으로 크게 나누어질 수 있는데. 이중에서도 특히 paste의 제조 공정이 중요하며 특히 바이오센서에서 필요한 반응을 매개하는 생체물질의 고정화에 응용할 수 있는 polymer-based enzyme paste의 개발에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다.²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾ 효과적인 센서반응을 위해 지금까지 알려진 working electrode의 ink에 포함되는 binder는 전극반응에 필요한 효소 기질과 NAD^+ 와 같은 조효소를 전극표면에 고정화시킬 수 있어야 하며, 동시에 이러한 biological entity가 전극에 intact하게 유지될 수 있도록 해야 할뿐만 아니라 측정대상물질이 전극표면으로 이동하여 생화학반응을 일으킬 수 있도록 전극표면의 친수성이 요구된다.²⁸⁾²⁹⁾

나. Amperometry

Amperometry는 일정한 전위 하에서 전극간에 흐르는 전류의 크기를 측정하는 원리로서 본 연구에서 개발하고자 하는 바이오센서의 효소측정 원리이기도 하다. 측정에 이용되는 전기화학적 시스템은 대개 working electrode, counter electrode, reference electrode의 삼전극계로 구성된다. Working electrode에는 측정대상물질에 대해 특이성을 갖는 효소나 기질 등을 고정화시키게 되며 효소반응에 의해 생성된 전기활성물질의 전기적 산화 또는 환원을 수행하게 된다. 따라서 전극구성물질의 특성 등이 amperometric 바

이오센서의 제작에 중요한 조건이 된다. Counter electrode는 working electrode에 대해 반대극성을 가지게 되며 전극간의 전류의 통로가 되므로 반응성이 낮으며 전기전도성이 큰 전극물질로 조성된다. Reference electrode는 working electrode에 일정한 전위가 유지 되도록 하며 높은 impedance에 의하여 이 전극 쪽으로는 전류가 흐르지 않게 된다. Reference electrode로는 SCE(saturated calomel electrode), NHE(normal hydrogen electrode), Ag/AgCl electrode등이 주로 사용되며 각각 상대적으로 일정한 전위차를 가지므로 일정한 전극전위를 인가할 수 있게 된다. 이러한 구성의 전극 시스템에서 효소반응 등을 통해 생성된 전기활성물질은 working electrode에서 산화 혹은 환원되며 이때 생성된 전류를 측정하여 시료 내의 측정대상물질의 농도를 알 수 있게 된다.³⁰⁾

다. 전기화학적으로 중합된 3,4-dihydroxybenzaldehyde(3,4-DHB)를 통한 NADH의 electrocatalytic oxidation

NAD⁺/NADH는 300 종이 넘는 dehydrogenase의 조효소로 이용되고 있어 그 전기화학적 특성에 대한 연구는 일찍부터 시작되었으며, 바이오센서에의 적용에 대한 높은 응용가능성으로 인해 현재까지도 활발히 연구가 이루어지고 있다. NAD⁺의 환원반응과 NADH의 산화반응 모두 전기화학식 바이오센서에 이용할 수 있으나 NAD⁺를 환원시킬 경우에는 시료에 존재하는 산소 등의 환원이 수반되므로 바이오센서에는 NADH의 산화를 원리로 적용하는 것이 대부분이다.³¹⁾³²⁾ 그러나, NADH를 전기화학적으로 직접 산화시킬 경우, 비교적 높은 전압에서 산화되는 특성을 지니고 있어 배경물질의 간섭현상 가능성을 배제할 수 없으며, NADH의 산화 시 생성되는 NAD⁺ radical의 전극으로의 흡착 등의 부반응에 의한 전극손상 등이 문제점으로 지적되어 왔으며, 이로 인해 전극물질의 선정, 전극의 전처리, 측정조건 설정 등이 바이오센서로의 적용 시 중요한 요건이 되는 것으로 알려졌다.³³⁾³⁴⁾³⁵⁾

이러한 문제점들을 해결하기 위해 많은 연구가 진행되어 왔는데, 그 중에서도 특히 electron mediator에 관한 연구가 많이 수행되었다.³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾ NADH의 electrocatalytic oxidation에 효과적인 물질로 o-quinone 계열의 화합물이 대표적이라고 할 수 있다. 그러나 이러한 mediated electrode는 electron mediator의 누출에 의한 바이오센서의 operational stability에 관한 문제점이 존재하게 되어⁴⁰⁾, electron mediator의 전극 내 고정화에 대해 많은 연구가 진행되었다. 그 예로 Kuwana와 Tse 등의 연구자는 1,2-hydroquinone이 covalent attache된 pyrolytic graphite 전극의 NADH 산화에 대한 catalytic activity에 대해 연구하였고,⁴¹⁾ 최근에는 glassy carbon electrode에서 전기화학적으로 중합된 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 NADH의 electrochemical oxidation에 대한 catalytic activity에 대한 연구결과가 Pariente 등에 의해 보고되었다.⁴²⁾ 또한 최근에는 glassy carbon electrode에서 전기화학적으로 중합된 3,4-DHB를 이용한 aldehyde 바이오센서가 NAD⁺-dependent dehydrogenase를 채용한 model case로 보고되었다.⁴³⁾

2. 실험 방법

가. 시약

L-lactate dehydrogenase(LDH, EC 1.1.1.27, Sigma type XI, from rabbit muscle, 850 U/mg), L(+)-lactate(lithium salt), β -nicotinamide adenine dinucleotide(β -NAD), β

-nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form(β -NADH, disodium salt) 등은 Sigma Co.로부터 구입하여 더 이상의 정제과정 없이 사용하였다. 3,4-dihydroxybenzaldehyde(3,4-DHB)는 Fluka Co., hydroxyethyl cellulose, ethylene glycol, graphite는 Aldrich Co.에서 구입한 것을 더 이상의 정제과정 없이 사용하였다. 이외에 사용한 모든 시약은 analytical grade를 이용하였으며, 모든 solution은 이차 증류수를 이용하여 제조하였다. 실험에 이용된 supporting electrolyte는 potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 8.20)를 이용하였다.

나. Instrumentation

Screen-printed thick-film electrode를 제작하기 위한 screen template는 미농상사로 부터 주문제작하여 이용하였으며, screen-printer로는 미농상사의 MSP 150M model을 사용하였고, 제작된 바이오센서에 대한 voltammetry, amperometry 실험과 시스템 구동은 Bioanalytical Systems, Inc.의 CV-50W voltammetric analyzer를 사용하였다.

다. 재료

후막소자기법을 이용한 바이오센서의 제작에 필요한 screen-printing ink로는 Acheson colloids의 Electrodag 427SS(silver ink), Electrodag 423SS(graphite ink), Electrodag 452SS(UV curable dielectric ink)를 이용하였다. 또한 Ag/AgCl pseudoreference electrode의 제작을 위한 printing ink는 MCA services의 Ag/AgCl ink를 사용하였다.

라. 기본전극의 제작

기본전극을 제작하기 위해 우선 polyester 기판을 100 mm × 100 mm 크기로 잘라 ethanol로 세척한 후 conducting path로서 silver ink를 print한 후 70°C oven에서 30분 간 경화시켰다. 여기에 working electrode와 counter electrode의 base가 되는 graphite ink를 print하고 같은 방법으로 열처리하고 다시 Ag/AgCl pseudoreference ink를 마찬가지로 처리하였다. 최종적으로 자외선에 의해 중합이 가능한 dielectric ink를 print하고 이를 UV crosslinker(Spectronics Co.)를 사용하여 중합하였다.(figure 3-2-1)

마. 작업전극(working electrode)의 제작

LDH biosensor의 작업전극은 graphite powder와 3,4-dihydroxybenzaldehyde (3,4-DHB), L-lactate, NAD⁺, 그리고 polymer binder 등으로 구성되었다. 우선 binder로서 hydroxyethyl cellulose(HEC)와 ethylene glycol(EG)을 각각 2%(w/v)와 6%(w/v)의 농도가 되도록 potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 8.2)에 녹인 후 여기에 3,4-DHB를 10 mg/mL의 농도가 되도록 용해시켰다. 이렇게 준비된 용액 0.3 mL에 graphite 200 mg, NAD⁺ 150 mg을 균일하게 잘 섞어준 후 기본전극의 working electrode pad에 print하고, 이를 4°C, 감압 상태에서 silica gel을 이용하여 건조시켰다. 건조된 전극에 다시 500 mg의 L-lactate가 균일하게 섞인 2% HEC 0.4 mL을 print하여 마찬가지로 건조시키고, 제작된 전극은 4°C에서 냉장 보관하였다.

바. 3,4-DHB를 통한 전극의 변형과 효소 농도의 전기화학적 측정

Voltammetry와 amperometry는 total volume 1 mL의 직접 제작된 reaction cell에서 수행되었다. 측정할 때마다 제작된 바이오센서의 단위소자를 가위를 이용해 절단하여 사용하였으며, 모든 실험은 상온에서 수행되었고 supporting electrolyte는 potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 8.2)를 이용하였다. 매 측정실험 전, -200 mV에서 +300 mV(vs. Ag/AgCl reference electrode)까지 약 10분 간 50 mV/s의 scan rate로 potential cycling을 수행함으로써 3,4-DHB의 electropolymerization을 유도하여 효소반응 결과 생성되는 NADH의 electrocatalytic oxidation에 적합한 형태로 전극을 변형하였으며, glassy carbon electrode의 경우, 1 mM 농도의 3,4-DHB 하에서 같은 방법으로 이루어졌다. 대상 시료의 측정을 위한 amperometry의 수행 시에는 변형된 전극에 +150 mV(vs. Ag/AgCl)의 전압을 인가하였으며, 이 때 발생하는 residual current가 안정화되기를 기다린 후 시료를 첨가하여 발생하는 전류를 측정하였다. 측정 대상 효소는 매 측정 시 새로이 만들어 사용하였다.

이하 표기되는 모든 전압은 Ag/AgCl reference electrode 대비로 표기하였다.

[연구 결과 및 고찰]

1. 후막소자기법을 이용한 기본전극의 제작

Screen-printing 기법을 통한 바이오센서의 제작을 위해 쓰인 screen-template는 254 mm × 254 mm 크기의 강철 골격에 15 N/m의 장력을 가진 stainless steel로 제작되었으며, screen template pattern은 전기화학적 분석 작업에 널리 이용되고 있는 three electrode system(working electrode, reference electrode, counter electrode)으로 구성되는 전극을 바이오센서의 동시대량제작의 목적에 부합되도록 고안한 것이다. 또한 작업전극에 쓰일 silver conducting track의 길이는 다른 것보다 약 8 mm 정도 짧게 제작하였는데, 이는 바이오센서를 이용한 대상물질의 전기화학적 측정 시 노출된 silver에 의한 noise를 제거하기 위함이다. Screen의 mesh number는 165와 250으로 제작하였는데, 여기서 mesh number란 1 inch 당 존재하는 선의 개수로 mesh number가 클수록 그 공극은 작아지고, mesh number가 작을수록 공극은 커지게 된다. 이렇게 제작된 바이오센서의 예를 figure 3-2-2에 나타내었다.

2. Glassy carbon electrode에서 전기화학적으로 deposit된 3,4-dihydroxybenzaldehyde (3,4-DHB)에 의한 NADH의 electrocatalytic oxidation

Screen-printed carbon electrode와 함께 carbon-based electrode에서의 전기화학적 연구에 많이 이용되는 glassy carbon electrode를 이용하여 전기중합된 3,4-DHB가 효소반응으로 생성된 NADH의 산화에 미치는 영향을 조사하였다.

3,4-DHB를 전술한 바와 같이 glassy carbon electrode에 전기화학적으로 중합시키고 이차 증류수로 세척한 후, 3,4-DHB가 들어있지 않은 potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 8.2)에서의 cyclic voltammetry를 통하여 변형된 glassy carbon electrode의 전기화학적 성질을 알아보았다.(figure 3-2-3) 그 결과, -200 mV에서 +300 mV까지의 potential

cycling을 통해 3,4-DHB를 중합시킨 경우 background scan과 비교하여 볼 때, +130 mV에서 anodic peak(E_{pa})가, +90 mV에서 cathodic peak(E_{pc})가 형성되는 것을 확인하였다. 일반적으로 이상적인 조건에서 확산이 가능할 경우, quinone 계열 화합물에 의한 NADH의 electrocatalytic oxidation은 two electron transfer 과정을 거치기 때문에 ΔE_p 값은 약 120 mV 정도를 나타내며, 이에 비해 전극에 고정화되어 확산이 불가능한 전기화학적 활성 물질은 거의 0에 가까운 ΔE_p 값을 나타내게 된다. 본 실험 결과, ΔE_p 가 40 mV로서 0보다는 큰 값이었으나, 120 mV에 비해 매우 작은 값을 나타내어 3,4-DHB의 전기중합의 징후를 확인할 수 있었다. Scan rate의 변화에 따른 anodic peak current(i_{pa})의 변화를 관찰한 결과, (figure 3-2-4, figure 3-2-5) scan rate가 증가함에 따라 i_{pa} 가 직선적으로 증가하는 것으로 드러났는데, 이는 3,4-DHB에 의해 변형된 glassy carbon electrode에서의 facile charge transfer kinetics를 반영하는 것이다. 이러한 결과들을 바탕으로 -200 mV에서 +300 mV까지의 potential cycling을 통해 3,4-DHB가 glassy carbon electrode에 고정화된 것을 확인할 수 있었으며, scanning을 여러 번 수행한 후에도 voltammogram의 변화가 거의 없는 것으로 미루어 볼 때, 고정화된 3,4-DHB는 전술된 실험조건에서 안정하게 유지되는 것을 관찰할 수 있었다.

3,4-DHB가 전기중합된 glassy carbon electrode 상에서의 NADH의 전기화학적 성질에 대해서 cyclic voltammetry를 통해 조사한 결과, figure 3-2-6에서와 같이 NADH의 electrocatalytic oxidation을 확인할 수 있었다. Background scan과 비교하여 볼 때, 약 +50 mV부터 anodic current가 발생하여 anodic peak current(i_{pa})가 증폭되었으며, 반대로 환원으로 인한 전류는 거의 발생하지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 glassy carbon electrode에 전기중합된 3,4-DHB는 NADH의 electrocatalytic oxidation을 매개함을 관찰할 수 있었으며, 증폭된 전류가 첨가된 NADH의 농도에 dependent한 것은 NADH의 산화에 의한 전류임을 입증하였다.

이러한 결과를 바탕으로 효소반응 결과 생성되는 NADH의 전기화학적 산화에 대해 변형된 전극이 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해, 2 mg/mL의 NAD^+ , 3 mg/mL의 L-lactate를 supporting electrolyte에 녹인 후, 3,4-DHB가 전기중합된 glassy carbon electrode를 이용하여 cyclic voltammetry를 수행하였는데, 그 결과를 Figure 3-2-7에 나타내었다. 효소를 첨가한 경우의 voltammogram을 그렇지 않은 경우의 voltammogram과 비교하여 볼 때, 효소를 첨가한 경우, 약 +50 mV부터 산화전류가 발생하고, i_{pa} 의 증폭과 함께 i_{pc} 의 감소가 일어나는 등, 전형적인 NADH의 electrocatalytic oxidation의 양상을 관찰할 수 있었다. 따라서 효소반응 결과 생성되는 NADH 역시 3,4-DHB에 의해 변형된 glassy carbon electrode에서 electrocatalytic oxidation을 일으킴이 확인되었는데, 이는 기존에 보고되었던 연구결과와도 일치하는 것이며, 또한 screen-printed carbon electrode에 대한 3,4-DHB의 적용가능성을 제시하였다.

3. 3,4-DHB가 전기중합된 LDH 측정용 thick-film electrode의 전기화학적 특성연구

전술한 바와 같이 LDH 측정용 thick-film electrode는 screen-printing 기법을 이용하여 제작된 기본전극 위에 conducting material인 graphite, 효소의 기질 및 조효소와 3,4-DHB, 그리고 이들을 효과적으로 고정화할 수 있는 polymer binder를 섞은 working ink를 print하는 방법으로 제작된다. 이렇게 제작된 thick-film electrode에서의 전기화학적 특성에 대한 연구를 수행하였다.

-200 mV에서 +300 mV까지의 potential cycling을 통한 thick-film electrode 내의

3,4-DHB의 고정화 유도 결과를 figure 3-2-8에 나타내었다. 첫 번째 scan 시에는 +200 mV부터 산화전류의 발생이 급격히 증가하였으나 이후 scan 횟수가 증가함에 따라 점점 감소하는 양상과 함께, +160 mV에서는 anodic peak이, +100 mV에서는 cathodic peak이 점차적으로 증가하여 일정 scan 이후 포화되는 양상을 볼 수 있다. 이러한 voltammogram은 scan 횟수의 증가에 따라 전극내부의 graphite particle 등에 점차적으로 3,4-DHB가 전기중합을 통해 고정화됨과 동시에, 고정화된 3,4-DHB가 전기화학적 산화-환원 반응에 대한 가역성을 지니고 있음을 입증한다. Thick-film electrode의 경우, binder component로 이용되는 polymer에 의한 charging current의 증가와 rough하고 porous한 전극표면에 기인한 specific surface area의 증가 등에 의해, glassy carbon electrode 및 기본전극과 비교해 전반적으로 current의 크기가 큰 voltammogram을 얻을 수 있었다. Scan rate의 증가에 따른 anodic peak current의 변화를 조사한 결과,(figure 3-2-9, figure 3-2-10) anodic peak current는 scan rate에 일차적으로 비례하는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 glassy carbon electrode, 기본전극 등과 마찬가지로 thick-film electrode에서 전기중합을 통해 고정화된 3,4-DHB 역시 facile electron transfer를 매개한다는 것을 보여주고 있다.

3,4-DHB가 전기중합을 통해 고정화된 thick-film electrode에서의 NADH의 전기화학적 특성조사를 위한 cyclic voltammetry 수행 결과(figure 3-2-11), 0 mV부터 anodic current가 발생하기 시작하여 +160 mV에서 maximum에 도달하였으며, cathodic peak current의 경우 현저히 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 또한 anodic peak current는 NADH 농도에 비례하여 증폭되는 것을 관찰할 수 있었는데, 이를 통해 관찰된 voltammogram은 NADH의 electrocatalytic oxidation에 의한 것임이 입증되었다.

4. 전기화학식 thick-film 바이오센서를 통한 LDH 농도의 측정

효소반응 결과 생성된 NADH의 최적 산화전압은 thick-film electrode 내에 전기중합을 통해 고정화된 3,4-DHB의 anodic peak potential인 +150 mV로 설정하였다. LDH의 농도 측정은 반응 부피 1 mL의 순수 제작된 reaction cell에서 이루어졌으며, +150 mV의 고정 전압을 가하여 residual current가 안정화되기를 기다린 후 LDH 시료를 첨가하여 발생하는 신호전류를 측정하는 방식으로 이루어졌으며, 그 결과를 figure 3-2-12에 나타내었다.

결과에서 알 수 있듯이, 50 U/L부터 700 U/L까지의 농도범위에서 신호전류가 직선적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 일반적으로, 정상 검체의 LDH 농도가 40 U/L에서 90 U/L인 점을 고려할 때, 제작된 바이오센서의 LDH 농도 분석 성능은 만족할만한 수준인 것으로 나타났다. 각 검체 내의 LDH 농도에 따른 신호전류 측정은 각기 다른 전극을 이용하여 5번씩 측정하였는데, 그림에서 볼 수 있듯이 작은 deviation이 관측되었으므로, 제작된 바이오센서는 재현성이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

제 3 절 자기조립 생체분자의 전기화학적 특성 연구

[연구개발 방법]

본 보고서에 기술된 전기화학 실험은 일반적인 3전극 (working, reference, counter

electrode) 전기화학 셀을 이용하여 수행하였다. reference 전극은 Ag/AgCl를 사용하였고, counter는 Pt wire를 사용하였다.

Gold (Au)는 polycrystalline을 사용하였으며, STM (Scanning Tunneling Microscopy) image를 얻기 위하여 표면구조가 잘 규명되어 있는 Au(111) 면을 사용하였다. Au(111) 면은 유리 또는 Mica 위에 입혀진 Au polycrystalline film에 H₂ flame을 가하여 얻었다.

실험에 사용된 thiol은 상업적으로 구입 가능한 시약을 정제하지 않고 바로 사용하였다. 금 표면 위에 자기 조립 단분자층 (SAM, Self Assembled Monolayer)은 thiol 수용액 (1~5 mM)을 금 표면 위에 5시간 이상 접촉시켜 얻었으며, 얻어진 thiol/Au SAM은 다음 실험을 위해 3차 증류수로 수회 충분히 씻어주었다. 실험은 pH 7.0의 phosphate buffer (20 mM) 수용액 존재 하에서 하였으며, 추가의 지지전해질은 넣지 않았다. Cyclic voltammogram은 BAS 100B (Bioanalytical System)을 이용하여 얻었으며, STM Image는 (Topomatrix TMX2000 SPM)을 이용하여 얻었다. 극미세전극배열 Chip의 전기화학적 감응을 stripping voltammetry를 통하여 연구하였다.

[연구 결과 및 고찰]

1. 연구결과

가. 자기 조립 단분자 막에 관한 연구

(1) 금 전극에서 자기 조립 단분자 막 형성

먼저 thiol 분자가 금표면에 얼마나 잘 흡착되는 가에 대해서 알아보았다. 1-dodecanthiol (CH₃(CH₂)₁₁SH) 와 NH₂PhSH 을 각각 에탄올에 녹인 다음 2 mm 금 disk을 담가두어 자기조립 단분자 막을 형성시킨 후 Fe(CN)₆³⁻가 어떻게 금 표면에서 전자 전달이 되는지를 관찰하였다. 금 표면에서는 Fe(CN)₆³⁻의 전극 반응 속도가 비교적 빨라서 전극반응이 가역적으로 일어나고 있는 것에 비해 thiol의 자기 조립 단분자 막이 금 표면에 있는 경우는 일반적으로 전극반응이 일어나지 않는다는 점을 이용하여 실험하였다⁴⁴). 그림 3-3-1 에서 이와 같은 사실을 확인하였고 또한 thiol 분자의 길이가 길수록 더 전자 전달 반응을 어렵게 한다는 것도 알 수 있었다.

(2) 자기 조립 단분자 막 자체가 산화환원 될 수 있는 thiol 합성

이제까지의 기존의 연구에서는 생체분자를 전극 표면과 결합시키는 물질은 금 전극과 생체분자를 연결할 뿐 그 물질 자체가 산화환원이 되는 것에 대해서는 생각하지 않았다. 본 연구에서는 자기 조립 단분자 막 자체도 산화 환원을 하여 Cytochrome c 와 전자를 교환하는 지를 알아보기 위한 기초 작업으로 새로운 thiol을 합성하였다.

(ㄱ) 1,4,5,8-Napthalene tetracarboxylic dianhydride (NTD) 0.56 mmol과 4-Amino thiophenol 0.56몰을 DMA(dimethylacetamide)에 녹인 후 N₂ condition 아래에서 적가하여 130℃에서 24시간동안 가열했다. 과량의 Diethylether를 넣어 반응을 끝내고 acetone과 ether로 충분히 씻어 주면서 filter를 하여 연녹색을 띠는 다음과 같은 thiol product(1)를 얻었다.(그림 3-3-2) ¹H NMR (CDCl₃ /Trifluoroaceticacid(TFA)-d): 7.3 (d,2H), 7.7

(d,2H), 8.9 (m,4H)

(ㄴ) 2-Amino ethanthiol 1.12 mmol을 같은 방법으로 NTD 0.56 mmol과 반응시켜 imide 양쪽에 thiol이 있는 화합물(2)을 합성하였다. (그림 3-3-2)

이와 같은 thiol-terminated oligomers는 gold와 강하게 결합하여 imide group은 DMF solvent에서 1개나 2개의 전자를 가역적으로 전달하고 있다. 이제까지 주로 연구되어온 imide film은 long alkyl chains을 이용한 flexible compounds였으나 여기서는 1에 4-(tert-Butyl)aniline을 이용하여 imide를 더 많이 연결함으로써 rigidity를 증가시키고 electrode와 electrophore 사이의 electron transfer에서 rigid bridge로써의 역할을 연구하는데 좋은 출발점이 될 수 있다. 1,2에서 C=O가 환원되어 radical-anion form을 형성하게 되는데 이 때의 산화 환원 과정에서 Cytochrome c가 monolayer 위에 위치하게 되면 어떤 영향을 주게 될지가 관심을 끈다.

(ㄷ) Perylene 3,4,10-tetracarboxylic dianhydride (PTD) 0.56 mmol 과 2-Amino ethanthiol 2.0mmol 을 NMP (N-methyl 2 pyrrolidione)에 녹여 N₂ condition 아래 140°C에서 2일 동안 반응시켰다. 여기서 주의할 점은 PTD의 solubility가 좋지 않으므로 두 물질을 섞기 전에 충분히 녹여준 뒤 반응을 진행시켜야 한다. 또한 질소분위기가 지켜지지 않으면 imidization이 제대로 일어나지 않고 side reaction이 진행되므로 이점에 대해서도 조심해야 한다. 합성된 물질(3)은 ¹³C NMR과 IR로 확인하였다.

PTD을 이용한 합성에 가장 중요한 점은 앞서서도 지적했듯이 잘 녹지 않는다는 점인데 합성된 product의 경우도 monolayer을 형성하기 위해서는 일정한 solvent에 녹여야 하는데 TFA에서 소량 녹는다는 점이 문제이다. 이점을 해결하기 위한 방법으로 PTD의 한 쪽 끝에 SO₃를 달아 solubility를 향상시키도록 하였다. 이에 대한 합성으로는 PTD 1.02 mmol과 Taurine 0.68 mmol을 DMA에 녹여 NaCO와 pyridine을 넣고 질소 분위기, 100°C에서 하루동안 반응시켜 검붉은 색의 product(4)를 얻었다.(그림3-3-2) Perylene derivatives에는 벤젠기가 4개나 있으므로 NTD보다 더욱 안정한 redox center로써 작용할 수 있기 때문에 thiol을 치환하여 monolayer를 만든 후, 이 전극과 monolayer, solvent 사이에서 Cytochrome c가 어떤 영향을 수행 할 수 있을지가 주목된다.

2. Cytochrome c 의 전기화학적 성질 및 Spectroscopy 연구

앞에서 금 전극위에서 thiol 분자를 통한 자기 조립 박막 층을 형성하는 기술을 익힌 후 Cytochrome c와 전극사이를 연결하는 modifier로 3-mercaptopropionic acid와 4,4-dithiopyridine (PySSPy)를 이용하여 연구하였다⁴⁵⁾.

가. mercaptopropionic acid 와 Cytochrome c (SAM과 Cytochrome c 간의 정전기적 상호작용)

Heme의 대부분은 hydrophobic 단백질에 둘러싸여 있고 수용액에 노출되는 부분은 전체 표면적의 0.06%로서 매우 작다. 그러나, 노출된 부분에는 많은 수의 lysine이며 이의 말단인 -NH₃에 의해 pH 7인 buffer 용액에서 positive 전하를 띄게 된다. 따라서 thiol분자의 한 쪽이 negative 전하를 가지는 분자를 이용하면 electrostatic 하게 서로를 결합시

킬 수 있게 된다.³ 본 연구에서는 3-mercaptopropionic acid ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)를 modifier로 이용하였다.

먼저 에탄올 용액에 10 mM 3-mercaptopropionic acid를 녹인 후, piranha solution (7:3 concentrated $\text{H}_2\text{SO}_4/30\% \text{H}_2\text{O}_2$)으로 전극표면의 유기물을 다 산화시키고 알루미나 가루로 polishing하여 깨끗한 금 전극을 3 시간 동안 담가두어 충분히 자기 조립 단분자 막을 형성시켰다. 전극을 에탄올로 충분히 씻어준 뒤 4.4 mM phosphate buffer (pH 7.0) 속에 30 μM Cytochrome c가 있는 용액에 담가두었다. 이러한 흡착 과정은 상온에서 보다 4°C의 저온에서 잘 이루어졌다. 전극을 overnight으로 담그고 꺼내어 4.4 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 충분히 씻고 이 buffer 용액에서 cyclic voltammetry를 관찰하였다. (그림 3-3-3) 여기서 Cytochrome c와 전극사이를 thiol 분자들의 자기 조립 박막층이 효과적으로 전자를 전달시켜 산화환원이 일어남을 알 수 있었다.

용액 속에서 Cytochrome c의 formal redox potential과 비교해 보면 대략 45 mV 정도 negative shift했다는 것을 알 수 있었다. 이는 Fe^{2+} 형태보다는 Fe^{3+} 형태의 Cytochrome c가 anionic 표면에서 더 강력하게 결합하기 때문이다. Membranous anionic 표면에서 결합될 때 larger shift가 일어난다는 사실을 볼 때 COOH 가 달린 thiol의 자기 조립 단막층이 biomembrane model을 electronically control하는데 좋은 후보가 될 수 있다(46)47)48). 실험에서 구한 cyclic voltammograms이 Laviron's model에서 예상되어지는 이상적인 모양을 나타내지 않는 것은 film defect sites에 기인한 adsorption distribution 등에 의해 peaks가 broad해지기 때문인 것 같다.

나. 4,4-dithiodipyridine (PySSPy)와 Cytochrome c

4,4-dithiodipyridine는 황 사이의 결합이 끊어지면서 금과 공유결합을 하게 된다. 단일 층으로 배열된 후 pyridine의 질소에서 Lewis base로 전자쌍을 제공하면서 Cytochrome c와 결합하게 된다. 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 10 mM 4,4-dithiodipyridine과 30 μM Cytochrome c를 넣고 금 전극을 담구었다. 여기서 흥미로운 점은 modifier와 Cytochrome c는 Diffusion control 된다는 점이다. (그림 3-3-3) 그 값을 계산하면 대략 $D_0=4.07 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 로서 이는 ferricyanide $D_0=7.78 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 의 1/19에 해당하는 값이다. 이는 Cytochrome c 분자가 커서 물질 이동 속도가 느리기 때문이다.

다. Cytochrome c의 IR 스펙트럼

IR 스펙트럼은 작은 분자들의 구조와 작용기를 연구하는 방법으로 많이 이용되어왔다. 그러나 단백질과 같은 거대 분자에서는 signal들이 겹쳐 몇 개의 peaks만이 나타난다는 문제점이 있었으나 근래에 X-ray crystallography나 NMR spectroscopy에서 관찰할 수 없는 membrane이나 용액 속의 단백질의 구조를 연구하는데 각광을 받기 시작했다.⁷ 앞으로 본 연구에서 관심을 가지는 것은 in situ에서 단백질의 산화환원에 따른 전극표면에서의 전자이동과 구조변화를 함께 밝히는 것이다.

본 연구에서는 Cytochrome c를 수용액에 담그고 IR 스펙트럼을 찍어본 결과 C=O stretching (1654 cm^{-1}) N-H bending (1548 cm^{-1})의 peaks를 얻었으며 앞으로의 연구를 수행하는 바탕이 될 것이다.(그림 3-3-4)

3. 자기 조립 생체 단분자막을 통한 일 방향 전자전달에 관한 연구.

- 직렬 및 병렬 전자 전달 경로의 자기 조립 단분자층의 개발.

가. L-Cysteine SAM에서 Cytochrom c와 PQQ의 전자 전달 반응

L-cysteine ($\text{HSCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$)을 Au와 접촉하여 금 표면위에 L-cysteine 의 S가 결합하여 그림 3-3-5와 같은 자기 조립 단분자층 (Self Assembled Monolayer, SAM)을 만들 수 있다. 이 때 용액 쪽으로 amino기와 carboxyl기가 위치하게 되는 데 실험에 사용한 pH 7.0의 buffer에서는 NH_3^+ 와 COO^- 의 전하를 띠게 된다. 이와 같이 서로 다른 전하가 동시에 전극 표면에 존재할 때, 전하를 달리하는 전기화학 활성종의 전기적 상호작용을 연구하였다. 사용한 전기화학 활성종은 cytochrome c와 pyrroloquinolinequinone (PQQ)이다. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)를 사용하여 cytochrome c와 carboxylic acid를 공유결합으로 연결 할 수 있다⁴⁹⁾. EDC는 여러 단백질의 amino기와 carboxyl기를 amide 결합으로 만들어 사슬 길이의 증가 없이 (zero-length) 연결하는 시약으로 일반적으로 사용하는 시약이다.

그림 3-3-6은 EDC를 이용하여 cytochrome c와 L-cystein/Au 의 carboxyl기를 공유결합으로 연결한 전극의 cyclic voltammogram이다. 그림 3-3-7은 PQQ^{3-} 가 L-cysteine/Au 에 전기적 인력에 의해 결합되어 있는 경우의 cyclic voltammogram이다. 각각의 경우 L-cysteine/Au 의 amino기 또는 carboxyl기에 결합하여 산화 환원 반응을 하고 있음을 알 수 있다.

그림 3-3-8는 동일한 L-cysteine/Au전극에 cytochrome c를 공유결합 시킨 후 다시 PQQ^{3-} 를 전기적 인력으로 결합시킨 전극의 cyclic voltammogram이다. Cytochrome c와 PQQ^{3-} 가 동일한 L-cysteine/Au의 서로 다른 두개의 작용기에 결합되어 있을 때 전극과 전자를 독립적으로 주고받을 수 있음을 알 수 있다.

이는 단분자막을 이용하여 두 개 이상의 작용기를 지닌 단분자막을 이용하여 biochip을 제작할 때 각각의 작용기에 결합되어 있는 전자 전달 물질을 통하여 동시에 전자전달을 할 수 있는 병렬회로의 제작 가능성을 보여 주고 있다.

나. Mercaptopropionic acid SAM에서의 Cytochrom c를 통한 전자 전달 반응 (SAM과 Cytochrome c 간의 공유결합).

Mercaptopropionic acid ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)를 Au와 접촉하면 Mercaptopropionic acid 의 S가 Au 표면에 결합한 SAM을 얻을 수 있다. 이 때 Au 표면에서 먼 쪽 (용액과의 계면 쪽)에 carboxylic acid ($-\text{COOH}$)가 있게 된다. 실험 1에서 설명한 바와 같이 이러한 carboxylic acid는 EDC(1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride) 존재하에서 cytochrome c와 공유결합을 형성한다.(그림 3-3-9) 본 실험은 이렇게 얻어진 전극을 통해 용액 중에 존재하는 전기화학 활성종으로의 전자 전달 반응을 연구하였다. 이와 같이 얻어진 전극의 cyclic voltammogram을 그림 2에 도시하였다.

전기화학적 활성종이 산화 환원 반응이 확산에 지배되는 경우 peak의 모양이 sigmoidal인 반면 표면에 흡착된 경우 대칭적인 gaussian형태의 peak가 얻어지게 된다.⁹ 그림 3-3-10는 기존 문헌에 보고된 바와 같이 전기화학적 활성종의 흡착된 경우의 전형적인 peak 모양을 보여주고 있다. 전기화학적 활성종이 흡착되어 있는 경우 식 (1)로부터 표면 위에 존재하는 활성 종의 덮임 정도(즉, 단위 면적 당 몰 수, mol/cm^2)를 구

할 수 있다.⁹

$$i_p = n^2 F^2 / (4RT) v A \Gamma_0^* \quad \text{----- (1)}$$

i_p 는 peak current, n 은 산화환원시의 전자 수, R 은 기체상수, F 는 faraday 상수, T 는 온도, v 는 주사 속도, A 는 전극의 넓이, Γ_0^* 는 덮임 정도이다.

실험에서 구해진 cytochrom c의 덮임 정도는 13.3 pmol/cm²으로서 기 보고된 문헌과 일치하고 있다. 또한 이 때 전극으로부터 활성 종으로의 전자전달 속도를 식 2 (α 는 0.5)로부터 예측할 수 있으며 전자전달 상수인 κ 값이 2.0/sec이다. 이 값은 기존 보고된 값이 탄소 길이가 16개인 경우가 주사속도에 따라 0.7~1.4/sec이고 탄소길이가 11개인 경우 0.9/sec인데 비해 큰 값이다⁵⁰⁾⁵¹⁾. 전자전달 반응의 속도는 구하는 방법에 따라 큰 차이를 보이며, CV의 환원 산화 peak의 분리 값(ΔE_p)으로 구하는 경우 다른 실험 방법으로 구한 값보다 작은 값을 보이며 아주 빠른 주사 속도에서 얻어진 값이 오차를 줄일 수 있다고 보고되어 있다. 본 실험에서 얻어진 값은 짧은 탄소 길이의 SAM으로부터 예측할 수 있듯이 그 값이 좀 더 큰 값을 얻었지만 이 값은 예견된 값보다 작은 값으로 추측되는 데, 이것은 실험 방법상의 차이에서 기인한다고 여겨진다.

$$\log \kappa = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log RT / nFv - \alpha(1 - \alpha)nF \Delta E_p / 2.3RT \quad \text{----- (2)}$$

그림 3-3-11a은 용액 중에 $K_3Fe(CN)_6$ 가 존재하는 경우의 cytochrome c/SAM/Au에 대한 cyclic voltammogram이다. 비교를 위하여 그림 3-3-11b에 Au 와 Au/SAM위에서의 용액 중에 존재하는 $K_3Fe(CN)_6$ 의 cyclic voltammogram을 도시하였다. carboxylic acid가 용액 쪽으로 노출되어 있는 SAM의 경우 용액의 pH가 7.0인 경우 $-COO^-$ 로 음의 전하를 띠게 된다. 따라서 전기화학 활성종인 $Fe(CN)_6^{3-}$ 의 경우 전기적인 반발력으로 인해 전극으로부터 전자를 받기 어려워지고 따라서 그림에서 보여진 바와 같이 Au 전극에서 가역적으로 나타나는 peak ($E_{1/2} = 0.2V$ vs. Ag/AgCl)가 사라짐을 알 수 있다. 용액 중에 $Fe(CN)_6^{3-}$ 가 존재하는 경우 SAM위에 cytochrome c의 cyclic voltammogram의 경우 환원 전류가 커져 있음을 알 수 있다. 이는 cytochrome c로 전달된 전자가 용액 중에 존재하는 $Fe(CN)_6^{3-}$ 으로 다시 전달되어 이를 환원하였기 때문이다.

이를 설명하기 위해 에너지 준위와 전자전달 기구에 대한 모식도를 그림 3-3-12에 도시하였다. cytochrome c의 산화환원 전위가 $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ 보다 더 음의 전위 값을 갖는다. 따라서 cytochrome c로 전달된 전자는 자연스럽게 $Fe(CN)_6^{3-}$ 으로 전달되게 된다. 따라서 cytochrome c는 계속해서 Au 전극으로부터 전자를 공급받게 됨으로 그의 환원 전류가 매우 커지게 되는 것이다. 이 때의 전극 반응은 용액중의 $Fe(CN)_6^{3-}$ 에 의해 확산 지배가 된다. 따라서 환원 peak의 모양도 sigmoidal 모양을 갖게 된다. 산화 반응의 경우 Fe로부터 cytochrome c로의 전자전달은 그림 3-3-12에 나타난 바와 같이 $Fe(CN)_6^{3-}$ 이 더 양의 값을 갖기 때문에 이루어지지 않는다.

그리고 cytochrom c로 전달된 전자의 경우 Au 쪽으로의 전자전달과 용액중의 $Fe(CN)_6^{3-}$ 쪽으로의 전자전달이 경쟁하게 됨으로 매우 빠른 주사 시에는 Au 전극 쪽으로의 전자 전달이 이루어져 산화 peak가 커지게 되는 것을 알 수 있다. (그림 3-3-13) 이처럼 자기 조립 단분자층에 cytochrome c를 결합시켰을 경우 이를 통해 전자전달이 다른 층 (phase, 본 실험에서는 solution phase)의 전기화학 종으로 전자전달이 일어날 수 있음을 알 수 있다.

또한 이 경우에 그림 3-3-12에 보여진 바와 같이 바깥 층 전기화학 활성종의 산화 환원 전압이 더 양의 값을 가질 경우, 한 쪽 방향으로의 전자 전달이 비 선형적으로 일어남을 알 수 있다.

실험 1에서 사용한 L-cysteine의 경우 동일한 실험을 수행하였다. 이 경우는 용액 쪽에 $-NH_3^+$ 가 여전히 노출되어 있어 음의 전하를 띄는 $Fe(CN)_6^{3-}$ 가 전극으로부터 직접 전자를 전달받을 수 있으므로 $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ 와 cytochrome c의 peak가 동시에 나타남을 알 수 있다. 또한 주사속도가 빨라짐에 따라 산화 환원 전류가 Cytochrome c의 경우 상대적으로 크게 증가함을 볼 수 있는데 이는 용액 중에서 확산에 지배받는 경우 산화 환원 전류가 제곱근에 비례하는 반면 전극표면에 흡착되어 있는 경우에 비례하기 때문이다⁵²⁾.

이처럼 L-cysteine의 경우 실험 1에서 언급했듯이 두 개의 서로 다른 기능기를 갖고, 이에 상응하는 서로 다른 전기화학 활성종이 독립적으로 전자 전달 반응을 일으키는 병렬 연결의 회로를 구성하는 반면 앞에서 언급한 3-mercaptopropionic acid의 경우 cytochrome c로 전자전달이 일어난 후 다음 층으로의 전자전달이 일어남으로 직렬 회로를 구성하게 된다.

4. Cytochrome c/Mercaptopropionic acid/Au의 표면 구조

가. Au(111) surface

STM 등의 표면구조 분석장치로 원자나 분자 수준의 정보를 얻기 위해서는 잘 정렬된 표면구조를 얻어야 한다⁵³⁾. 초고진공에서 ion sputtering과 annealing 등으로 깨끗하고 정렬된 표면을 만드는 방법은 수십 년 전부터 확립되어 있었고, 공기 중에서, 또한 화학적인 면에서 중요한 용액 중에서 이러한 표면을 제조하는 실험 기법들도 발전되어 왔다. 특히 금 재료는 상대적으로 제조하기가 쉽고 공기 중에 상당한 시간동안 노출되어도 오염이 적어서 in-situ 표면 화학에서 가장 빈번히 사용된 substrate 재료 중의 하나이다⁵⁴⁾.

Au(111) surface는 여러 가지 금 표면 중 가장 안정한 면으로, 실용성이 높은 금 박막 재료는 Au(111)과 유사한 성질을 가진다. 일반적으로 Au(111) 표면을 제조하기 위해서 수소 불꽃 등으로 일정 시간 동안 가열해 주게 되는데, 가열해 주는 동안 표면의 불순물 등을 기화시키고, 표면 금 원자들의 이동성을 증가시켜 표면을 원자수준에서 평평하게 만들어 준다⁵⁵⁾.

그림 3-3-14에 수소 불꽃으로 약 5분간 가열한 Au(111) 단결정의 표면을 공기 중에서 STM으로 관찰한 것을 나타내었다. 이미지의 왼쪽 부분에 작은 계단들이 보이고, 오른쪽 부분에는 삼각 모양의 크기 100-200 nm 정도의 Au(111) 테라스가 보인다. 테라스의 모양이 대체로 정삼각형 모양인 것은 Au(111)의 표면 원자 배열이 hexagonal structure이기 때문이다. 각 테라스들은 원자수준에서 평평한 면이며, 테라스간의 계단들은 단 원자 계단들이다.

원자 분해능의 이미지를 얻고자 시도했으나, background 잡음의 수준이 높아 성공하지 못하였다. 적합한 방진장치를 이용하고, 물 박막 등의 방해가 없는 수용액 중에서 시도한다면 성공률이 높을 것이다.

나. $HS(CH_2)_2COOH/Au(111)$

위에서 제조된 Au(111) 표면을 HS(CH₂)₂COOH 용액에 약 200 분간 담가서 자기조립 단일층을 만든 후, 에틸 알콜과 증류수로 세척하고 질소 가스로 건조시켜, STM으로 공기 중에서 관찰하였다.(그림 3-3-15) alkanethiol/Au 의 전형적이 양상대로, 표면의 대체로 울퉁불퉁 해지고 테라스에 vacancy island 들이 생성된다.

일반적으로, long-chain alkanethiol의 경우, 그 기본적인 구조가 ($\sqrt{3} \times \sqrt{3}$)이고, 그 위에 c(4x4) 등의 superstructure를 이루는 것으로 알려져 있다. 또한, tail group 에 따라 여러 가지 형태로 변화된 구조를 가진다. 이번 실험에서는 분자 분해능의 이미지를 얻지 못하였다. 그 원인은, 단분자층 안에 부피가 큰 COOH 작용기가 포함되어 잘 정렬된 분자층을 이루지 못하기 때문일 수도 있고, background 잡음 수준이 높기 때문일 수도 있다.

cyto. c/HS(CH₂)₂COOH/Au(111) 위의 분자층에 EDC를 이용하여 cytochrome c를 공유 결합시킨 후 공기 중에서 STM으로 관찰한 이미지를 그림 3-3-16에 나타내었다. 테라스 상의 많은 vacancy island 등을 비교할 때 단일 분자층 만을 입힌 그림 3-3-15과 거의 유사한 이미지이다. 이는 분자 분해능이 아닌 수 백 nm 수준의 이미지에서 예상되는 결과이다.

STM으로 SAM/Au(111)과 cyto. c/SAM/Au(111)의 분자 구조에 관한 분자 수준에서의 정보를 얻기 위해선 여러 가지 실험적인 개선이 필요하다. 1) background 잡음 수준이 높으므로 이를 제거하기 위한 방진장치가 필요하다. 2) HS(CH₂)₂COOH와 일반적인 alkanethiol의 혼합 단일층이 HS(CH₂)₂COOH 만의 단일층 보다 잘 정렬되어 있을 것이라고 예상된다. HS(CH₂)₂COOH의 양을 alkanethiol의 양보다 상당히 적게 하면 STM으로 alkanethiol 단일층 중에 흩어져 있는 HS(CH₂)₂COOH 분자들을 관찰하기가 쉬워질 것이다. 또한 cyto. c/SAM/Au(111) 경우, cyto. c 분자들이 배열되어 있는 구조를 관찰할 수도 있을 것이다. 3) 공기 중에서 STM 이미지를 얻을 경우, 자연히 생성되는 물 박막의 방해 받을 수 있고, cyto. c 등 생체 분자들이 용액 중의 분자 구조와 다를 수 있다. 따라서 용액 중에서 이미지를 얻는 것이 이점이 많을 것이다. 이러한 경우 용액 속에 담긴 STM tip에서 흐르는 faradaic 전류를 최소화시키기 위해 tip을 절연 물질로 코팅할 필요가 있다.

5. 극미세전극 배열 Chip 연구

본 연구의 수행을 위해 중요한 것 중의 하나가 바로 어떻게 Chip을 만들 것인가 하는 점이다. 생체분자 (Cytochrome c, ferredoxin 등)를 자기 조립 박막층을 입힌 아주 작은 전극 표면에 배열하여 기존의 공기 중에서 사용되는 Chip과는 달리 용액 속에서 작용하는 'Biochip' 을 만들기 위해 이용될 극미세전극 배열 Chip을 연구하였다⁵⁶⁾⁵⁷⁾⁵⁸⁾.

먼저, 극미세전극은 일반 전극과는 다른 여러 가지 특징을 가지고 있다. 크기가 작기 때문에 적은 부피의 시료 측정이 가능하며, 이러한 특징은 단백질 등의 생체 분자를 연구 하는데 많은 도움이 된다. 낮은 faradaic 전류가 흘러 ohmic potential drop이 매우 적다. 또한 전극의 크기가 작아질수록 limiting current density가 증가하게 되며 voltammetry 의 signal 대 noise의 비는 향상된다. 극미세전극에서는 확산 속도가 빨라서 signal의 변화를 역시 빠르게 하면서 steady-state polarization curves도 볼 수 있다.

그림 3-3-17에서 전체 극미세전극 Chip의 배열을 보여주고 있다. 용액과 반응을 하는 working electrode 부분을 제외하고는 다른 부분이 용액이나 다른 불순물과 반응하여 signal에 영향을 주지 않도록 표면을 Silicon Nitride로 덮었다. 이점은 앞으로의 연구가

기존의 공기중이 아닌 용액에서 진행될 점으로 볼 때 아주 중요한 관건이 된다. 즉, 이제까지는 전자가 wire를 지나가면서 공기 중에서 날아가거나 혹은 반응하는 것들에 대해서는 고려할 필요가 없었지만 용액 속에서는 전자가 connecting wire 통해 용액에 노출되거나 다른 산화환원 반응을 일으키지 않고 전달되는 것이 중요하므로 표면을 완전히 덮어 주는 것이 중요하다. 실제 실험을 해 본 결과 아직은 완전히 표면을 용액과 차단하지 못해서 noise 나 error의 요인이 되고 있다. 즉 제조된 극미세전극 Chip을 가지고 실험했을 때를 살펴보면 기존의 극미세전극으로 사용되고 있는 것과는 좀 다른 signal을 보여주고 있다. (그림 3-3-18)

이것은 앞에서 지적했듯이 working electrode 외에 용액에 노출되는 부분 등에 의해 전류가 많이 흐르고 있으며 극미세전극 특유의 signal이 나오고 있지 않음을 알 수 있다. 따라서 기존의 기술보다 더욱더 정밀한 기술이 요구된다.

2차 년도에서는 기존에 제작되었던 극미세전극 배열 칩의 문제점 (current leakage, 절연층의 박리 등)을 해결하는데 성공하였다. 새로 제작된 칩은 상용화되어 있는 미세전극 (non-array)과 거의 같은 전압전류특성을 재현성 있게 나타내었고, 지름 수~수십 μm 범위에서 원하는 크기의 미세전극을 얻을 수 있었다.(그림 3-3-19)

제작된 극미세전극에 stripping voltammetry technique을 사용해 실험한 결과 수용액 중에서 ppb 수준의 저 농도 금속이온을 수 분 내에 검출할 수 있었으며 peak 전류 값은 금속이온의 농도와 비례함을 확인하였다. 미세전극의 이러한 높은 감도는 그 작은 크기와 더불어 bio chip의 제작에 기여할 수 있을 것이다.

또한 미세전극의 표면에 다른 물질 (A라 가정)을 입힐 경우 원래 전극을 구성하는 물질의 종류와 관계없이 A로 만들어진 전극처럼 행동한다는 것을 알 수 있었다. 이것은 미세전극 제작 후에 자기조립박막 등으로 표면처리를 함으로써 생화학적 활성을 가지는 전극을 만들 수 있음을 의미한다. 이 전극은 바로 biosensor로 응용이 가능하다.

제 4 절 생화학적 소자 재료의 합성

[연구개발 방법]

1. Mouse 및 *Bacillus Stearothermophilus* ferredoxin의 제조

Ferredoxin은 생체 내에서 다양한 metabolism에 관여하며, iron-sulfur group을 가지고 있는 전자 전달 단백질이다. 이러한 ferredoxin은 강한 negative redox potential로부터, 알 수 있듯이 강한 환원제로 작용하며 전자를 전달하는 기능을 수행한다. Mouse ferredoxin의 경우는 2Fe-2S system이고, *Bacillus ferredoxin*의 경우는 4Fe-4S system이다. Ferredoxin은 cytochrome c 와 함께 가장 많은 연구가 이루어진 전자 전달 단백질이라 할 수 있다. Mouse ferredoxin⁵⁹⁾, *Bacillus ferredoxin*⁶⁰⁾ and cytochrome c 각각의 redox potential은 -0.6, -0.4, 0.2로 각기 다른 값들을 가지고 있으며 이들의 각기 다른 redox potential을 이용하여 새로운 소자 재료 합성에 기여할 수 있을 것이다. 특히 내열균주의 *B. Stearothermophilus*에서 분리된 *Bacillus ferredoxin*은 열에 매우 안정할 것으로 예상된다.

가. Ferredoxin 유전자의 cloning

(1) Mouse ferredoxin

MFUP (5' CGC GGA TCC AGC AGC TCA GAA GAT AAG A 3')와 MFDN (5' CGG GGT ACC TTA GGA ATT CTT GCT CAT G 3')을 이용하고, mouse kidney cDNA library를 template로 하여, PCR을 통해 ferredoxin의 coding sequence를 포함하는 PCR product를 얻었다. 이 PCR product를 pQE30 expression vector에 클로닝 하였고 클로닝된 mouse의 coding sequence는 DNA sequencing으로 확인 하였다. pQE30 expression vector는 insertion된 대상 단백질을 T5 promotor를 통해서 overexpression시킨다. 이때 발현되는 단백질의 N-terminal부분에는 6개의 Histidine(His-tag)이 fusion된다. 이러한 His-tag은 affinity column에 이용하여 단백질의 정제를 쉽게 할 수 있다.

(2) *B. Stearotherophilus* ferredoxin

Bacillus ferredoxin 유전자를 클로닝하기 위하여 이미 알려진 아미노산 서열을 이용하여 degenerated primer를 제작하였다. 합성된 degenerated primer는 다음과 같다.

1 Pro Lys Tyr Thr Ile Val Asp Lys Glu Thr
CCN AAT UAY ACN AUH GUN GAY AAR GAR ACN

Glu Pro Phe Asp Gly Asp Pro Asn Lys Phe Asp 81
GAR CCN UUY GAY GGN GAY CCN AAY AAR UUY GAY TAA

위의 두 primer를 이용하여 내열성 박테리아인 *B. Stearotherophilus ferredoxin*의 유전자를 *B. Stearotherophilus* chromosomal DNA를 template로 하여 PCR로 증폭하였다. 얻어진 PCR product를 mouse ferredoxin의 경우와 마찬가지로 pQE30 expression vector에 클로닝 하였고 클로닝된 유전자의 DNA sequence를 결정하였다.

나. 대장균에서 재조합 ferredoxin 단백질의 발현 및 정제

(1) pQE30 expression vector를 *Escherichia coli* (M15/pREP4)에 transformation시키고 다음의 순서로 정제하였다.

cell lysis → affinity chromatography (Ni-NTA agarose) → dialysis
→ anion-exchange chromatography → gel filtration → lyophilize

Expression vector를 가지고 있는 M15/pREP4 세포를 LB media (ampicillin 100mg/L and kanamycin 25mg/L)에서 600 nm optical density가 0.4에서 0.6 사이가 될 때까지 배양하였다. 이때 최종 농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 가하고 ferric ammonium sulfate를 iron 공급원으로 넣어주었다. 그 후 4 시간 더 배양하고 세포를 7000 rpm의 속도로 4°C에서 10 분 동안 원심분리 하여 수확하였다. 얻어진 cell pellet은 lysis buffer (20 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, 5mM imidazole pH 8.0 at 5°C)에 녹이고, sonication을 통하여 세포를 lysis시켜 세포 추출물을 얻었다. 세포 추출물을 Ni-NTA column에 가하고 affinity chromatography를 이용하여 His-tag 재조합 단백질을 부분 정제하였다. 부분 정제된 단백질을 anion-exchange chromatography와 gel filtration을 통하여 mouse, *Bacillus ferredoxin*을 순수 정제하고 lyophilization 한 후에 보관하였다.

2. Carboxyl-terminated alkanethiol의 합성

Cytochrome c를 시작으로 하여 많은 전자 전달 단백질들의 전기 화학적인 특징을 밝히기 위하여 많은 방법들이 고안되었다. 그 중에서 가장 많이 연구되었고 효과적인 방법이 self-assembled monolayer (SAM)이라 할 수 있다. SH- group은 용액 상에서 금과 반응하여 covalent bond를 형성하는데 이를 이용하여 다양한 SH-compound (thiol)들을 금 전극 위에 반응시키고, 이 전극 위에서 monolayer를 얻을 수 있다⁶¹). 이때 금 전극은 순수한 금 표면이 아니라 원하는 functional group을 가지고 있는 thiol 이 layer를 이루고 있게 되며 이들을 promotor로 하여서 전극 위에서의 단백질의 전자 전달 현상을 관찰할 수 있게 된다⁶²).

이러한 thiol중에 가장 많이 이용되고 있는 것이 carboxyl-terminated alkanethiol이라 할 수 있다. Carboxyl-terminated alkanethiol은 말단에 -COOH group을 가지고 있어 다양한 단백질과 interaction을 할 수 있고 이를 이용하여 많은 유기화학적 반응을 시킬 수도 있으며 SH- 과 -COOH사이의 탄소 chain의 길이에 따라 원하는 길이의 monolayer를 만들 수도 있다. 본 연구에서는 길이가 다양한 carboxyl-terminated alkanethiol을 합성하였다.

가. 6-mercaptohexanoic acid과 11-mercaptoundecanoic acid의 합성

Carboxyl-terminated alkanethiol 은 아래와 같은 반응⁶³)을 통하여 합성하였다.



1. acid



2. base

n=5 6-mercaptohexanoic acid

n=10 11-mercaptoundecanoic acid

(1) 6-mercaptohexanoic acid를 만들기 위하여 Na 금속 (2.53 g, 110 mg-atom)을

degassed methanol 150 mL에 넣고 얻어진 용액을 ice-bath에서 식히고 이 용액에 thiolacetic acid 7.3 ml, 103 mmol과 6-bromohexanoic acid 10 g, 51 mmol을 넣고 6 시간동안 argon하에서 reflux하였다. 그후 용액을 상온으로 식힌 후에 15 ml conc. HCl을 가하고 다시 약 15 시간 동안 더 reflux하였다. 반응 혼합물을 다시 상온으로 식히고, 300 ml의 ether을 가하고 ether층을 100 ml의 물로 세 번 그리고 NaCl용액 100 ml로 한번씩 추출하면서 불순물을 제거하였다. MgSO₄로 남아 있는 수분을 제거한 후 vacuum상태에서 ether를 제거하여 methyl 6-mercaptohexanoate를 얻는다. 이 ester 부분은 100 ml degassed methanol, 50 ml 1 N NaOH과 함께 3 시간 동안의 refluxing을 통해서 hydrolysis시켰다. 마지막으로 6-mercaptohexanoic acid는 eluant로 methylene chloride에 9% ether를 섞은 용액을 사용하여 column chromatography를 하여 정제하였다.

(2) 11-mercaptoundecanoic acid의 경우는 6-mercaptohexanoic acid의 합성 방법과 동일 하며 6-bromohexanoic acid 대신에 11-bromoundecanoic acid를 사용하였다.

나. 16-mercaptohexadecanoic acid의 합성

16-bromohexadecanoic acid의 합성은 전에 기술된 방법을 기초로 하였다. 48% hydrobromic acid 와 glacial acetic acid를 1:1로 섞은 용액에 16-hydroxyhexadecanoic acid를 넣고 2 day동안 reflux하였다. 반응 혼합물을 식힌 후 생긴 결정을 걸러서 얻어내고 물로 씻어낸 후 hexane을 이용하여 재결정하였다. 이렇게 해서 생긴 bromide는 100 ml methanol에 Na 금속 0.96 g (40.9 mg-atom), thiolacetic acid 2.9 ml (40.9 mmol), 16-bromohexadecanoic acid 7.0 g (20.9 mmol)을 각각 넣고 15 시간 정도 refluxing을 통하여 thioacetate형태로 만들었다. 반응 혼합물을 상온으로 식힌 후 degassed 1 N NaOH를 50 ml 가하고 3 시간 refluxing을 통하여 thioester를 hydrolysis시켰다. 이렇게 얻은 thiol을 ether층에 녹게 하고 역시 물과 NaCl 용액으로 불순물을 제거하였다. 16-mercaptohexadecanoic acid의 경우에는 column chromatography 대신에 hexane을 이용한 재결정을 이용하여 정제를 하였다.

3. NTA-terminated thiol의 합성

His-tag은 Ni affinity chromatography로 재조합 단백질의 분리 정제를 쉽게 하기 위하여 DNA level에서 단백질에 도입된다. 이러한 His-tagged 단백질을 이용하여 고체 표면 위에 일정한 방향으로 정렬을 하는 단백질 layer를 만들기 위하여 NTA group을 가지고 있는 thiol을 제조하고 이들이 고체표면에서 SAM을 형성하게 한다. NTA group은 Ni²⁺와 complex를 이루고 남아 있는 Ni²⁺의 vacant site 두 개와 단백질의 His-tag과 chelation하게 된다. 이러한 NTA-terminated thiol의 이용은 생화학적 생체 고분자의 전극 위에서의 이상적인 monolayer를 형성함에 있어서 커다란 기여를 할 수 있을 것이다.

이러한 NTA-terminated thiol의 합성 방법⁶⁴⁾은 그림 3-4-1 에 나타나 있다.

가. Undec-1-en-11-yltri(ethylene glycol) (그림 3-4-1a)의 합성

50% NaOH 수용액 0.34 ml (4.3 mmol)과 tri(ethylene glycol) 3.2 g (21 mmol)을 섞고 100°C oil bath에서 30 분간 반응시켰다. 이때 1.0 g (4.3 mmol)의 11-bromoundec-1-ene을 넣었다. 24 시간 후에 반응 혼합물을 식히고 hexane으로 6 번 추출해 내었다. Rotary evaporation을 통해 hexane을 날리면 monomer와 dimer가 생기고 이들은 ethyl acetate를 eluant로 하여 column chromatography로 정제하였다.

나. N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid (그림 3-4-1b)의 합성

전에 기술된 방법⁷에 따라 N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid를 합성하였다.

41.7 g의 bromoacetic acid를 2 M NaOH 용액 150 ml에 녹이고 이를 0°C로 식혔다. 2 M NaOH용액 225 ml에 42 g의 N-benzyloxycarbonyl-L-lysine을 녹이고 이 용액을 0°C로 식힌 bromoacetic acid 용액에 천천히 가했다. 2 시간 후에 상온으로 반응 혼합물을 두고 24 시간동안 반응시켰다. 그 후에 2 시간동안 50°C로 가열하고 이 용액에 450 ml의 1 M HCl을 천천히 가했다. 용액을 식힘에 따라 침전이 생기며 이 침전은 1 M NaOH로 녹이고 1 M HCl로 다시 침전을 시킴으로 불순물을 제거하였다. 이렇게 생긴 lysine derivative는 5% Pd/C를 촉매로 하여 수소기체 하에서 hydrogenation이 되면서 최종 화합물을 얻을 수 있었다.

다. NTA-terminated olefin (그림 3-4-1d)의 합성

합성한 udec-1-en-11-yltri(ethylene glycol) 3.5 g을 35 ml methylene chloride에 녹인 후 carbonyldiimidazole 3.8 g(2 equiv)을 가했다. 2 시간동안 반응을 진행시킨 후 ethyl acetate를 eluant로 column을 통해 oil 형태의 imidazole carbamate (그림 3-4-1c)를 정제하였다. 역시 미리 합성된 amine (그림 3-4-1b) 8.0 g을 물 100 ml에 녹이고, 12 N NaOH를 이용하여 pH 10.2로 조절한 후에 130 ml의 dimethylformamide (DMF)를 넣었다. 이 용액에 4.5 g의 iminazole carbamate를 10 ml의 DMF에 녹인 용액을 한 방울씩 천천히 가했다. 12 시간동안의 반응후에 물 500 ml를 더 넣고 250 ml정도의 ethyl acetate로 추출함으로써 불순물을 제거하였다. 이때 다시 물층을 6 N HCl을 이용 pH 1.5까지 만들고 ethyl acetate로 NTA-terminated olefin을 추출해 내었다.

라. NTA-terminated thioacetate (그림 3-4-1e)의 합성

NTA-terminated olefin 1.0 g을 5 ml 정도의 tetrahydrofuran에 녹이고 4 당량의 thioacetic acid와 소량의 azobis(isobutyronitrile) (AIBN)을 넣은 뒤 산소를 제거하고 250 nm UV lamp를 이용하여 약 6 시간동안 반응을 시켰다. 얻어진 혼합물은 vacuum 상태에서 용매를 제거하고 acetate-hexane의 재결정을 통하여 정제하였다.

마. NTA-terminated thiol (그림 3-4-1f)의 합성

1 g의 thioacetate(그림 3-4-1e)에 10 당량의 0.1 M NaOCH₃를 가하고 이 용액을 H₂ 기체로 치환시켰다. 이 상태에서 약 30 분간 반응을 시킨 뒤에 NH₄Cl로 반응을 멈추었다. 이 혼합 용액에 10% HCl을 이용, 산성으로 만든 후에 ethyl acetate로 추출하여 최종 NTA-terminated thiol⁶⁵⁾을 얻었다.

4. Bovine brain cytochrome b5과 *E. coli* bacterioferritin의 합성

Cytochrome b5는 microsomal membrane의 integral component 단백질로 많은 전자 전달에 관여하며 또한 cytochrome c와 같이 heme을 가지고 있는 비교적 작은 단백질이다. 이러한 cytochrome b5는 하나의 heme을 가지고 있으며 100개 정도의 아미노산으로 이루어져 있는 N-terminal 부분과 40개 정도의 아미노산으로 이루어져 있으며 membrane에 binding하고 있는 C-terminal 부분으로 나눌 수 있다⁶⁶⁾. Cytochrome b5의 redox potential은 -100 mV정도이며 cytochrome c와 서로 다른 net charge를 가지고 있기 때문에 이들의 interaction에 대해서도 많은 연구가 이루어져 있다. 이러한 cytochrome b5의 전기 화학적 특징을 연구함으로써 전자 전달 단백질 사이의 전자의 이동에 대해 알아볼 수 있을 것이다. 이러한 전자 전달 단백질 사이의 interaction은 새로운 소자재료를 이용한 diode등을 만드는 경우에 있어서 가장 중요한 요소 중에 하나라고 할 수 있다.

Cytochrome b5의 재조합 단백질의 경우에는 많은 방법이 제시되어 있다. 특히 물에 녹는 N-terminal 부분만을 정제한다면 이들의 수용액상에서의 전기 화학적인 면을 쉽게 연구할 수 있게 된다.

철 저장 단백질은 생체 내에서 이루어지는 많은 metabolism에서 필요한 철을 공급하고 남아 있는 철을 non-toxic한 형태로 저장한다. 이들은 19000정도의 분자량을 가지고 있는 monomer가 24 개 모여서 하나의 철 저장 단백질을 이루며 이 구 형태의 단백질 안에 4000 개 정도의 철을 저장한다. 이런 단백질에는 ferritin과 bacterioferritin의 두 종류가 있는데 bacterioferritin은 ferritin과 달리 저장한 철과는 별도로 12개의 heme을 가지고 있다. 현재 이 heme의 역할은 정확히 알려지지 않았고 몇몇 group에 의해서 재조합 단백질로 얻은 bacterioferritin의 다양한 특징⁶⁷⁾을 조사하고 있는 정도이다. bacterioferritin은 cytochrome 계열의 단백질과 같이 heme을 가지고 있고 환경에 따라 -200에서 -500mV까지 다양한 redox potential⁶⁸⁾을 가지고 있다. 하지만 그 큰 분자량과 두 개의 monomer사이에 있는 heme은 cytochrome 계열의 단백질과는 다른 경향을 보여주고 있으므로 이 bacterioferritin의 전극 위에서의 전기 화학적인 특성을 알아보는 일은 아주 흥미로운 일이라 할 수 있다.

가. Cytochrome b5와 bacterioferritin 유전자의 cloning

(1) bovine cytochrome b5

Cytochrome b5의 tryptic fragment는 84개의 아미노산으로 이루어져 있으며 전체 134 개 (Ala1-Asn133)의 아미노산중 Ala7-Lys90만을 말한다. 이러한 tryptic fragment를 코드하는 DAN fragment를 얻기 위해 다음과 같은 primer를 제작하였다.

Cytb5UP (5'CGC GGA TCC GCC GTT AAG TAC TAC ACC C 3'), Cytb5DN (5' CGG GGT ACC TCA CTT TGA TCT GTC ATC CG 3'). 제작된 primer를 이용하고 RT PCR을 이용하여 bovine brain mRNA pool을 template로 bovine cytochrome b5 유전자를 증폭하고 pQE30 expression vector에 클로닝하였다.

(2) Bactrioferritin

대장균 bacterioferritin 유전자를 클로닝하기 위하여 다음과 같은 primer를 제작하였다. BfrUP (5' CGC GGA TCC ATG AAA GGT GAT ACT AAA GTT 3'), BfrDN (5' CGG GGT ACC TCA ACC TTC TTC GCG 3'). 제작된 primer를 이용하고 *E. coli*의 chromosomal DNA를 template로 하여 PCR로 bacterioferritin의 유전자를 증폭하고 pQE30 expression vector에 클로닝 하였다.

나. His-tag fusion 재조합 단백질의 발현 및 정제

(1) Heme containing holocytochrome b5와 24mer holobacterioferritin의 overexpression.

Cytochrome b5의 tryptic fragment cDNA가 cloning되어있는 expression vector를 M15[pREP4] host strain에 transformation시켰다. 이 세포는 LB media (ampicillin 100 mg/L and kanamycin 25 mg/L)에서 seed culture를 한 후에 300 ml LB에 dilution하여 충분한 공기를 공급하면서 배양하였다. 600 nm에서의 optical density가 0.5 정도가 되었을 때 최종 농도가 0.002 mM이 되도록 IPTG를 넣고 다시 약 20 시간 정도 세포를 더 배양하였다. 이렇게 다량으로 발현된 단백질을 가지고 있는 cell culture는 역시 ferredoxin의 경우와 마찬가지로 7000 rpm의 속도로 4°C에서 10 분 동안 원심분리 하여 pellet을 얻었다. Bacterioferritin의 경우도 같은 방법으로 세포를 배양하였다. 역시 0.002mM의 IPTG를 맞추는 것은 heme을 가지고 있는 단백질을 만드는데 가장 중요한 부분이었다.

(2) Cytochrome b5와 bacterioferritin의 정제

Cytochrome b5의 경우는 ferredoxin의 정제와 마찬가지로 sonication을 통하여 용액상의 단백질을 얻고 이들을 Ni-NTA affinity column을 이용하여 정제하였다. Bacterioferritin의 경우에는 용액상의 단백질을 얻은 후에 65°C에서 70°C사이에서 15 분 정도 가열하였다. 이 과정은 bacterioferritin이 열에 매우 안정한 점을 이용한 정제 과정인데 이 과정은 전체적인 bacterioferritin의 정제에 매우 중요한 역할을 차지한다⁶⁹. 가열 후에는 열에 약한 단백질이 흰색 덩어리로 생기며 원심분리를 통하여 제거하였다. 이 다음과정은 역시 Ni-NTA affinity column을 이용하였다.

5. 재조합 단백질의 특성 조사

가. UV-visible spectrum

UV-visible spectrum은 만들어진 단백질의 확인에 가장 간단히 이용할 수 있는 방법이며 확실한 방법이라 할 수 있다. 본 연구를 통하여 만들어진 네 가지의 단백질의 경우 각기 고유의 spectra가 밝혀져 있으며 이를 비교함으로써 합성 여부를 확인할 수 있다. 특히 bacterioferritin의 경우는 spectrum으로 단백질의 정제여부에 대한 판단이 가능하다. 대부분의 경우 spectrophotometer를 이용 250 nm에서 650 nm까지 scanning하였다.

나. Denaturing와 nondenaturing gel

발현되어진 단백질의 1차적인 확인은 5%-15% SDS PAGE protein denaturing gel을 통하여 하고 cytochrome b5와 bacterioferritin의 경우에는 이들의 holoprotein과 apoprotein을 구별하기 위해서 5%-12% native (nondenaturing)gel을 사용했다.

6. Cyclic voltammetry를 이용한 전자 전달 단백질의 전기 화학적 특성 조사

Cyclic voltammetry는 electroactive한 다양한 물질의 조사에 있어서 가장 유용한 전기 화학적 방법으로 알려져 있다. 이러한 cyclic voltammetry는 생화학적 재료의 전기 화학적 특성을 알아보는데 가장 먼저 실험되어지는 방법이다. 본 연구에서는 다양한 전자 전달 단백질들의 전극 위에서의 전자 전달 현상을 관찰하기 위하여 이러한 CV를 이용하려 하였다.

가. SAM 전극의 준비

(1) 금 전극의 표면 처리

금 전극의 표면을 깨끗이 하는 과정은 이상적인 전자 전달 현상을 보기 위해 가장 중요한 부분이다. 증착에 의해서 만들어진 전극의 경우는 사용하기 전에 수소 불꽃을 이용하여 annealing을 시킴으로 해서 Au(111)의 깨끗한 전극을 얻을 수 있었다. 이에 반해 Au (polycrystalline)의 경우에는 다음의 과정을 거쳐 전극의 표면을 처리하였다. 먼저 사포로 표면을 갈고 3 μM , 1 μM diamond의 순서로 각각 금 표면을 polishing한 후에 0.3 μM , 0.05 μM alumina로 다시 polishing하는 순서로 점점 작은 크기로 전극의 표면을 처리하여 고른 표면을 얻을 수 있었다.

(2) SAM 전극의 제조

전극을 1 mM 농도로 녹아있는 thiol 알콜용액에 약 24시간 정도 반응을 시킴으로써 SAM 전극을 얻을 수 있었다.

나. 전자 전달 단백질의 cyclic voltammogram (CV)

(1) Cytochrome c

(가) Non-covalent bond⁷⁰⁾를 이용한 CV

원하는 carboxyl terminated thiol의 SAM이 형성된 전극은 물과 알콜로 씻고 약 100 μ M의 단백질 용액을 30분 동안 가했다. 이때 단백질과 thiol의 terminal functional group ($-\text{COO}^-$)사이의 interaction에 의해서 단백질은 전극 표면에 붙게 된다. 이 상태의 전극은 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0에서 Ag/AgCl 전극을 reference 전극으로 하여 cyclic voltammogram을 얻었다.

(나) Covalent bond를 이용한 전자 전달 단백질의 CV

위와 같은 방법은 thiol과 단백질간의 전기적 interaction에 의한 실험인데 반하여 cytochrome c를 carboxyl terminated thiol의 $-\text{COOH}$ 에 bond를 형성하게 하여 붙이는 방법도 있다. 가장 대표적인 방법으로 NHS (N-hydroxysuccinimide), EDC(1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride)의 두 시약을 이용한 방법⁷¹⁾을 들 수 있다.

단백질의 immobilization을 위하여 carboxyl terminated thiol은 75 mM EDC 15 mM NHS 수용액에 약 10 초에서 30 분간 담가 두었다. NHS에 의해서 activation된 NHS ester monolayer는 약 30 μ M 단백질 용액에 가하며 약 30 분간의 반응을 통하여 단백질을 covalent bond에 의하여 금 전극 위에 고정시켰다. 이때 반응 용액은 10 mM sodium phosphate buffer pH 8.0을 사용하였다.

(2) Ferredoxin

Ferredoxin은 pI가 4.0 정도로 매우 강한 negative charge를 나타낸다. 전극 위에서 ferredoxin의 전자 전달을 CV를 통하여 연구한 예가 많이 있지만 cytochrome c와 같이 금 전극 위에 형성된 monolayer위에서 이루어진 연구는 아직까지 발표되지 않았다. 대부분의 경우는 carbon⁷²⁾전극이나 viologen으로 입혀진 금 전극⁷³⁾ 등의 상태에서 연구가 이루어졌다. 본 연구에서는 먼저 cytochrome c에서 사용한 방법들을 이용하여 ferredoxin의 CV를 보았으나 이와 같은 system에서는 ferredoxin의 전자 전달을 전극 위에서 볼 수 없다는 결론을 내릴 수 있었다 (data not shown). 다음으로는 cytochrome b5와 같은 acidic 단백질 (negative net charge)의 CV를 연구하는데 이용되는 방법으로 양이온을 promotor로 사용하는 방법과 $-\text{NH}_3^+$ 을 terminal group으로 가지고 있는 thiol을 사용하여 ferredoxin과의 interaction을 유도하여 보았다. 그러나 역시 전자 전달을 볼 수 없었다 (data not shown). 결론적으로 ferredoxin과 같은 iron-sulfur 전자 전달 단백질의 경우에는 규칙적인 monolayer가 형성 되어있는 금 전극 위에서는 전자 전달을 할 수 없다는 것을 알게 되었다.

(3) Cytochrome b5

Cytochrome b5도 역시 cytochrome c와는 다르게 전체적으로 negative charge를 가지고 있기 때문에 cytochrome c의 CV를 얻는 방법과 같은 방법을 사용할 수는 없다. 가장 많이 쓰이는 방법으로 poly-L-lysine⁷⁴⁾을 사용하는 방법을 들 수 있다. poly-L-lysine은 서로 같은 charge를 가지고 있는 thiol의 $-\text{COO}^-$ 와 cytochrome

b5를 전기적으로 연결시킬 수 있다.

Carboxyl terminated thiol SAM 전극을 100 μ M cytochrome b5용액에 담그고 약 1 시간동안 평형상태를 유지시킨 후 500 μ M정도의 농도가 되도록 poly-L-lysine 용액을 가하였다. 역시 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0에서 CV를 얻었다.

[연구 개발 결과]

1. Mouse와 *Bacillus ferredoxin*의 재조합 단백질의 제조

가. Ferredoxin 유전자 cloning

(1) pQE30 expression vector에 mouse ferredoxin과 *Bacillus ferredoxin* 유전자를 클로닝 하였으며 클로닝된 유전자의 DAN sequence를 결정하였다. 이들의 DNA sequence는 다음과 같다.

Mosue ferredoxin coding sequence:

```
AGC AGC TCA GAA GAT AAG ATA ACA GTC CAC TTC AAG AAC CGA
GAT GGC GAG ACG CTA ACG ACC AAG GGG AAA ATT GGC GAC TCT
CTG CTA GAT GTT GTG ATT GAG AAC AAC TTA GAT ATC GAT
GGG TTT GGT GCG TGT GAG GGA ACG TTG GCT TGC TCT ACT TGT
CAT CTT ATC TTT GAG GAT CAC ATC TAT GAG AAG TTA GAT
GCC ATT ACT GAT GAA GAG AAT GAC ATG CTT GAC CTG GCT TTT
GGA CTA ACA GAC AGG TCA AGG TTG GGC TGC CAA GTT TGT CTG
ACC AAG GCT ATG GAC AAT ATG ACT GTG CGT GTG CCT GAA GCA
GTG GCG GAT GTC CGA CAG TCT GTT GAC ATG AGC AAG AAT TCC
```

Bacillus ferredoxin coding sequence:

```
CCT AAG TAT ACA ATT GTT GAT AAA GAA ACA TGT ATC GCC
TGT GGA GCG TGC GGA GCA GCA GCT CCA GAC ATT TAC GAC TAC
GAT GAA GAC GGC ATC GCC TAC GTC ACT TTA GAC GAT AAC CAA
GGT ATC GTA GAA GTT CCG GAA ATT TTG ATC GAC GAC ATG
ATG GAT GCC TTC GAA GGC TGC CCA ACC GAG TCG ATT AAA GTC
GCG GAC GAG CCA TTT GAC GGA GAC CCG AAT AAA TTT GAT
```

나. 재조합 단백질의 정제

(1) Mouse ferredoxin (adrenodoxin)의 정제

Mouse ferredoxin 재조합 단백질을 His-tag fusion 단백질로 대장균에서 발현시키고 정제하였다. 1-litter culture로부터 99% homogeneous fusion protein을 약 20 mg 얻었다. Mouse ferredoxin은 mitochondrial matrix에 존재하며 13.6 kD의 iron-sulfur protein (2Fe-2S)이며 -0.6의 redox potential을 갖는다. 그림 3-4-2는 mouse ferredoxin의 UV-visible spectra와 다량으로 발현된 재조합 단백질의 15% SDS PAGE gel을 나타낸다. mouse ferredoxin은 그 iron-sulfur로 인해 옅은 갈색을 나타내고 있으며, UV-visible spectra는 발표된 다른 ferredoxin의 전형적인 형태¹를 보여주고 있다.

Mouse ferredoxin의 아미노산 서열은 다음과 같다.

Ser Ser Ser Glu Asp Lys Ile Thr Val His Phe Lys Asn Arg Asp Gly Glu Thr Leu
 Thr Thr Lys Gly Lys Ile Gly Asp Ser Leu Leu Asp Val Val Ile Glu Asn Asn Leu
 Asp Ala Asp GlyPhe Hly Ala Cys Glu Gly Thr Leu Ala CysSer Thr Cys His Leu Ile
 Phe Glu Asp His Ile Tyr Glu Lys Leu Asp Ala Ile Thr Asp Glu Glu Asn Asp Met
 Leu Asp Leu Ala Phe Gly Leu Thr Asp Arg Ser Arg Leu Gly Cys Gln Val Cys Leu
 Thr Lys Ala Met Asp Asn Met Thr Val Arg Val Pro Glu Ala Val Ala Asp Val Arg
 Gln Ser Val Asp Met Ser Lys Asn Ser

(2) *Bacillus ferredoxin*의 정제

*Bacillus ferredoxin*도 mouse ferredoxin과 같이 His-tag fusion 단백질로 발현시키고 정제하였다. Affinity chromatography 후에 약 15 mg/(1L cell culture)의 재조합 단백질을 얻었다. *Bacillus ferredoxin*은 81개의 아미노산으로 이루어져 있으며 -0.2 V 정도의 redox potential을 가지고 있다. 그림 3-4-3는 *Bacillus ferredoxin*의 15% SDS PAGE gel과 UV-visible spectra를 나타내고 있다. *Bacillus ferredoxin*의 경우는 affinity column만으로는 완전히 정제가 되지 않는 것처럼 gel에 세 개의 band가 보인다. Ferredoxin과 interaction을 하는 다른 단백질들이 같이 따라 오거나 ferredoxin의 multimer 이 생기는 것으로 생각된다. 이 *Bacillus ferredoxin*의 이용을 위해서는 gel filtration이나 ion-exchange column같은 정제 과정이 더 필요할 것이다.

*Bacillus ferredoxin*의 아미노산 서열은 다음과 같다.

Pro Lys Tyr Thr Ile Val Asp Lys Glu Thr Cys Ile Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala
 Ala Ala Pro Asp Ile Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Gly Ile Ala Tyr Val Thr Leu Asp
 Asp Asn Gln Gly Ile Val Glu Val Pro Asp Ile Leu Ile Asp Asp Met Met Asp Ala
 Phe Glu Gly Cys Pro Thr Glu Ser Ile Lys Val Ala Asp Glu Pro Phe Asp Gly Asp
 Pro Asn Lys Phe Asp

2. Carboxyl-terminated alkanethiol의 합성

가. 6-mercaptohexanoic acid와 11-mercaptoundecanoic acid의 합성

6-mercaptohexanoic acid의 경우 3 g정도 oil형태로 얻어지며, 약 47%의 수득률을 보였다. 11-mercaptopundecaic acid는 chain의 길이가 길어짐에 따라 상온에서 하얀 고체로 2.5 g을 얻었다. 이들의 확인은 다음과 같은 NMR data를 통해서 확인하였다. $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$ δ 2.49 (q, 2H), 2.32 (t, 2H), 1.59 (m, 4H), 1.42 (m, 2H), 1.30 (t, 1H).

나. 16-mercaptohexadecanoic acid의 합성

역시 고체상태에서 얻어지며, 0.75 g의 최종 product를 얻었다. 역시 다음과 같은 NMR data를 통해 확인하였다. $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$ δ 2.53 (q, 2H), 2.35 (t, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.28 (m).

3. NTA-terminated thiol의 합성

NTA-terminated thiol의 합성경로는 그림 3-4-1에 나타나 있다. 그림 3-4-1b의 NTA-terminated lysine의 경우는 물에서 반응이 이루어지기 때문에 그 정제가 용이하지 않았다. 산과 염기 상태에서의 반응물의 상태 변화를 이용하여 불순물을 제거하였다. 그림 3-4-1d의 NTA-terminated olefin의 확인은 $^1\text{H NMR}$ 분석을 통하여 가능하였다. (CD_3OD , 200MHz) δ 5.80 (m, 1H), 5.00 (dd, 1H), 4.92 (dd, 1H), 4.13 (t, 2H), 3.60 (br m, 14H), 3.47 (m, 3H), 3.08 (t, 2H), 2.02 (m, 2H), 1.78 (m, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.52 (br m, 4H), 1.28 (br m, 14H). 그림 3-4-1e의 NTA-terminated thioacetate의 합성에 있어서 많은 양의 반응물을 한꺼번에 반응시키면 반응이 일어나지 않는다. Olefin을 약 1g정도씩만 반응 시켜서 thioacetate를 얻음 수 있었다. 이때 얻은 노란색의 침전물을 얻었다. 이와 같은 thioacetate의 합성여부는 NMR에서 olefin에 의한 peak가 사라지고 acetate에 의한 peak가 생기는 것으로 확인할 수 있었다. $^1\text{H NMR (CD}_3\text{OD, 200MHz)}$ δ 4.14 (t, 2H), 3.63 (br m, 14H), 3.44 (m, 3H), 3.09 (t, 2H), 2.85 (t, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.78 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.54 (br m, 8H), 1.29 (br m, 14H). 그림 3-4-1f의 최종 NTA-terminated thiol의 합성은 발표되어있는 방법에 의하면 I_2 과 triethylphosphine를 사용한다. 그러나 국내에서는 triethylphosphine을 구할 수 없기 때문에 아래와 같은 방법을 사용하였다.



↑

0.1 N CH_3ONa in CH_3OH

5-10 min, yield 95-100%

위와 같은 반응을 이용하여 약 30 분 정도의 반응을 통하여 hydrolysis를 시켜 NTA terminated thiol을 얻을 수 있었다. $^1\text{H NMR(DMSO)}$ δ 7.18 (t, 1H), 4.01 (t, 2H), 3.49 (br m, 14H), 3.34 (m, 3H), 2.91 (q, 2H), 2.44 (q, 2H), 2.21 (t, 1H), 1.51 (br m, 5H), 1.22 (br m, 17H)

4. Bovine brain cytochrome b5와 *E. coli* bacterioferritin의 제조

가. Bovine cytochrome b5와 bacterioferritin 유전자의 cloning

pQE30 expression vector에 bovine cytochrome b5 tryptic fragment를 coding하는 sequence와 *E. coli* bacterioferritin 유전자를 클로닝 하였다. 이들의 DNA sequence는 DNA sequencing으로 확인하였다. 이들의 DNA sequence는 다음과 같다.

Bovine brain cytochrome b5 tryptic fragment:

```
ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC GCC GTT AAG TAC TAC
ACC CTG GAA GAG ATC CAG AAG CAC AAC AAC AGC AAG AGC ACC
TGG CTG ATC CTG CAC TAC AAA GTG TAC GAT TTG ACC AAA TTT
TTG GAG GAG CAT CCT GGT GGG GAG GAA GTC TTA AGG GAA CAA
GCT GGA GGT GAT GCC ACT GAA AAC TTT GAG GAT GTT GGA CAC
TCT ACA GAT GCT CGA GAA TTG TCC AAA ACG TTC ATC ATT GGG
GAG CTG CAC CCG GAT GAC AGA TCA AAG
```

밑줄은 His-tag coding sequence.

E. coli bacterioferritin:

```
ATG AAA GGT GAT ACT AAA GTT ATA AAT TAT CTC AAC AAA CTG
TTG GGA AAT GAG CTT GTC GCA ATC AAT CAG TAC TTT CTC CAT
GCC CGA ATG TTT AAA AAC TGG GGT CTC AAA CGT CTC AAT GAT
GTG GAG TAT CAT GAA TCC ATT GAT GAG ATG AAA CAC GCC GAT
CGT TAT ATT GAG CGC ATT CTT TTT CTG GAA GGT CTT CCA AAC
TTA CAG GAC CTG GGC AAA CTG AAC ATT GGT GAA GAT GTT GAG
GAA ATG CTG CGT TCT GAT CTG GCA CTT GAG CTG GAT GGC GCG
AAG AAT TTG CGT GAG GCA ATT GGT TAT GCC GAT AGC GTT CAT
GAT TAC GTC AGC CGC GAT ATG ATG ATA GAA ATT TTG CGT GAT
GAA GAA GGC CAT ATC GAC TGG CTG GAA ACG GAA CTT GAT CTG
ATT CAG AAG ATG GGC CTG CAA AAT TAT CTG CAA GCA CAG ATC
CGC GAA GAA GGT TGA
```

나. 재조합 단백질의 정제

(1) Holoprotein의 overexpression

Heme containing 단백질의 정제에 있어서 가장 중요한 점은 apoprotein에 heme이 insertion되는 것이라 할 수 있다. 단백질의 overexpression될 때 IPTG에 의한 induction은 IPTG를 넣은 후 6시간 안에 모두 일어난다. 1 mM IPTG에 의한 다량 발현을 했을 때 한꺼번에 apoprotein이 너무 많이 발현되기 때문에 heme의 insertion이 일어나지 않는다. 또한 이제까지 발표된 대부분의 경우에 있어서 발현된 hemeprotein의 일부분만이 heme을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 점을

개선하기 위하여 먼저 IPTG의 농도를 변화시켜 발현되는 단백질의 양을 조절하였다. 그림 3-4-4a,b는 cytochrome b5와 bacterioferritin의 발현을 IPTG 농도에 의한 조절능력을 15% SDS PAGE gel을 통하여 본 것이다. 이에서 알 수 있듯이 M15[pREP4]를 host strain으로 사용할 때 IPTG의 농도를 조절함으로써 원하는 단백질의 발현정도를 아주 간단히 조절할 수 있다.

본 연구에서는 이와 같이 IPTG농도에 따라 발현되는 단백질의 양을 관찰하고 이와 동시에 이들 각각의 경우에 있어서 heme insertion이 얼마나 일어나는지를 연구하였다. 그 결과 cytochrome b5의 경우에는 0.002 mM IPTG 농도에서 가장 많은 holoprotein이 발현되며, 이와 같은 조건에서 발현되는 단백질의 90%이상이 heme를 가지고 있는 holoprotein으로 발현되는 것을 볼 수 있었다. 이에 반해 bacterioferritin은 높은 농도의 IPTG induction하에서 조금 더 많은 holoprotein이 발현되지만 이 경우 apoprotein도 같이 발현되기 때문에 효율적인 정제를 위하여 모든 단백질이 holoprotein의 형태로 발현되도록 IPTG (0.002 mM)을 결정하였다. 그림 3-4-5는 이러한 IPTG농도에 따른 holo, apoprotein의 상대적인 발현 정도를 보기 위하여 12% nondenaturing gel에 전기 영동 한 결과이다.

(2) Bovine brain cytochrome b5 tryptic fragment

0.002 mM IPTG induction에 의하여 affinity column으로 정제하여 98%정도의 순수한 cytochrome b5를 얻었다. 1L cell culture로부터 약 14 mg의 holoprotein을 얻었다. 세포배양을 할 때 heme 단백질의 발현에 의해 배양액의 색은 연한 빨간색을 나타내었다. 이러한 coloration은 heme 단백질 발현의 첫 신호라 할 수 있다. 그림 3-4-6a는 cytochrome b5의 UV-visible spectra이며 발표되어있는 자료와 같은 형태를 보여주고 있다⁷⁵⁾. 약 10 kD정도의 분자량을 가지고 있는 tryptic fragment의 아미노산 서열은 다음과 같다.

Ala Val Lys Tyr Tyr Thr Leu Glu Glu Ile Gln Lys His Asn Asn Ser Lys Ser Thr
Trp Leu Ile Leu His Tyr Lys Val Tyr Asp Leu Thr Lys Phe Leu Glu Glu His P개
Gly Gly Glu Glu Val Leu Arg Glu Gln Ala Gly Gly Asp Aal Thr Glu Asn Phe Glu
Asp Val Gly His Ser Thr Asp Aal Arg Glu Leu Ser Lys Thr Phe Ile Ile Gly Glu
Leu His P개 Asp Asp Arg Ser Lys

(3) *E. coli* bacterioferritin

역시 0.002 mM IPTG inducition에 의하여 affinity column 한번의 정제에 의해 99.9%이상의 깨끗한 holoprotein을 얻었다. bacterioferritin의 경우는 24mer의 큰 단백질이어서 하나 하나의 monomer가 모두 His-tag을 가지고 있다. 그 결과 affinity chromatography에서 매우 강한 결합을 하고 한번의 정제로 매우 순수한 단백질을 얻을 수 있는 것이다. 이와 같은 방법은 bacterioferritin과 같은 단백질의 정제에 있어서 매우 유용한 방법이 될 것이다. 1 L cell culture로부터 30 mg의 holoprotein을 정제할 수 있었다. Bacterioferritin의 경우에도 culture의 red coloration이 일어난다. 그림 3-4-6b는 bacterioferritin의 UV-visible spectra를 보여준다. bacterioferritin의 경우에는 413 nm부분의 peak의 크기가 holoprotein정도를 보여준다⁷⁶⁾. 이번 연구에

서는 12개의 heme이 모두 들어가 있는 완전한 holoprotein을 다량 얻을 수 있었다. 158개의 아미노산으로 이루어진 bacterioferritin의 아미노산 서열은 다음과 같다.

Met Lys Gly Asp Thr Lys Val Ile Asn Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Glu Leu Val Ala Ile Asn Gln Tyr Phe Leu His Ala Arg Met Phe Lys Asn Trp Gly Leu Lys Arg Leu Asn Asp Val Glu Tyr His Glu Ser Ile Asp Glu Met Lys His Ala Asp Arg Tyr Ile Glu Arg Ile Leu Phe Leu Glu Gly Leu Pro Asn Leu Gln Asp Leu Gly Lys Leu Asn Ile Gly Glu Asp Val Glu Glu Met Leu Arg Ser Asp Leu Ala Leu Glu Leu Asp Gly Ala Lys Asn Leu Arg Glu Ala Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val His Asp Tyr Val Ser Arg Asp Met Met Ile Glu Ile Leu Arg Asp Glu Glu Gly His Ile Asp Trp Leu Glu Thr Glu Leu Asp Leu Ile Gln Lys Met Gly Leu Gln Asn Tyr Leu Gln Ala Gln Ile Arg Glu Glu Gly

5. Cyclic voltammetry를 이용한 전자 전달 단백질의 전기 화학적 특성 조사

가. 금 전극의 표면처리

여러 가지 크기의 diamond나 alumina등으로 polishing하여 금 전극의 청결도는 0.05 M H₂SO₄에서 0 V-1.6 V사이의 CV로 확인하였다.

나. Cytochrome c

Cytochrome c의 redox potential은 thiol의 종류, buffer의 pH나 농도등에 따라서 다르게 나온다. 일반적으로 carboxyl terminated thiol의 SAM위에서 pH 7.0일 때 0.2 V vs NHE 정도의 redox potential을 나타낸다.¹² 본 연구에서는 referece 전극으로 Ag/AgCl (0.23 V vs NHE) 을 사용하기 때문에 0 V부근에서 redox potential이 관찰되었다. 모든 CV는 Ag/AgCl 전극을 기준으로 나타내었다.

(1) Non-covalent cytochrome c

그림 3-4-7a는 6-mercaptohexanoic acid (-S(CH₂)₅COO⁻)의 SAM 위에서 cytochrome c를 전기적인 interaction으로 non-covalent 상태의 CV를 얻은 것이다. 0 V 부근에서의 redox potential을 보여주고 있으며 약 75 mV의 peak separation을 나타낸다. 또한 scan rate에 따라 CV의 peak 크기가 커지는 것으로 전극과 단백질과의 전자 전달로 인해 생긴 CV임을 알 수 있다. 그에 반하여 그림 3-4-7b의 경우는 cystamine(-SCH₂CH₂NH₃⁺)을 SAM으로 한 전극을 이용하여 같은 charge를 가지고 있을 경우의 cytochrome c의 CV를 보여주고 있다. 80 mV부근에서 redox potential을 가지며 그 peak separation도 200 mV 가까이 된다.

(2) Covalent cytochrome c

그림 3-4-8은 cystamine과 3-mercapto propionic acid (HSCH₂CH₂COO⁻)를 1:1로 섞은 후 이들의 SAM을 입힌 전극 위에서 cytochrome c를 EDC-NHS를 이용하여 covalent bond로 흡착시킨 상태의 CV이다. 역시 0 V에서 redox potential을 가지며

전극 위에 cytochrome c 의 monolayer가 형성된 증거로 peak separation이 거의 없는 것을 볼 수 있다.

다. Cytochrome b5

그림 3-4-9는 cysteine (HSCH₂CH₂(-NH₃⁺)COO⁻)을 입힌 SAM을 이용한 것이다. cysteine은 terminal functional group으로 -NH₃⁺과 COO⁻를 모두 가지고 있는 thiol 이어서 cytochrome c와 cytochrome b5의 CV를 동시에 볼 수 있는 thiol로 알려져 있다. 이와 같은 cysteine을 이용하고 promotor로 poly-L-lysine을 이용하여 cytochrome b5의 CV를 얻은 것이다. 그림에서 볼 수 있듯이 poly-L-lysine이 없을 때에는 단백질에 의한 peak가 전혀 나오지 않고 있다. 이 경우는 0.6 vs NHE 인 수은 reference 전극을 사용하였다. 결국 cytochrome b5 tryptic fragment의 redox potential은 0 V vs NHE인 것을 알 수 있었다.

제 5 절 미소영역에서의 극미량 bio-object의 이송을 위한 기본요소 및 미소현상 연구

[연구 개발 방법]

1. 혈액 물성(표면장력, 밀도)의 실험적 측정 및 분석

극소량의 바이오 물질을 하나의 칩으로 분석하기 위해서는 반도체 가공기술을 이용한 소형화가 필수적이며, 극소량의 바이오 물질의 미소채널 내 거동에 대한 해석이 필수적으로 요구된다⁷⁷⁾. 분석대상 바이오 물질은 사람의 혈액을 택했다. 따라서 우선적으로 혈액에 대한 표면장력과 밀도 등의 물성치를 측정하였고, 미소채널을 제작하여 모세관현상을 이용한 미소영역에서 혈액의 거동을 살펴보았다.

혈액의 물성치를 측정하기 위해 채혈용으로 항응고제 CDPA용액(USP) 56ml 용량의 B형 적혈구 농축액(Packed Red Cells)을 사용하였다. 먼저 메스실린더와 미세정밀측정 전자저울을 이용하여 혈액의 밀도를 측정하였다. 점도는 Ubbelohde Viscometer를 이용한 Ostwald법으로 측정하였다. Ostwald법에 의한 점도의 측정은 아래 식에서 얻어진다.

$$\nu = \nu_r \frac{t}{t_r}$$

여기서 ν_r 는 Reference kinematic viscosity ($1 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ for water), t_r 은 Reference time (344 seconds for water), t 는 조사대상이 되는 액체가 viscometer의 일정길이를 통과하는데 걸리는 시간을 나타낸다.

유체와 고체면과의 접촉각을 θ 라고 할 때 다음과 같은 관계식을 얻을 수 있다.

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}}$$

일정 접촉각의 경우 spreading coefficient, $S_{L/S}$ 는 $S_{L/S} = \gamma_{SV} - \gamma_{LV} - \gamma_{SL}$ 이 된다. 정량적으로 말하면 γ_{SL} 과 γ_{LV} 는 가능한 한 작게 되어야 wetting 이 일어나게 된다.

한편, Contact angle은 혈액이 유리와 공기에 맞닿을 때 혈액이 유리표면과 이루는 각을 말하며, (그림 3-5-1)에서 보인 바와 같이 유리 모세관을 혈액에 담은 후, 유리표면의 외부에서 혈액과 유리표면이 공기 중에서 이룬 각을 측정하였다. 또한, 표면장력은 모세관현상으로 따라 올라간 혈액의 높이를 측정하면 다음 식에 의해 표면장력을 알 수 있다.

$$\sigma = \frac{\rho g R}{2 \cos \theta} \Delta h$$

여기서 ρ 는 밀도, θ 는 Contact angle, R 은 모세관의 반경, Δh 는 모세관현상에 의해 올라간 높이를 나타낸다.

이러한 미세영역에서의 모세관현상을 관찰하기 위해 (그림 3-5-2)와 같이 총 4가지 형태로 디자인된 마이크로채널을 각각 4가지 치수로 제작하여 총 16종의 마이크로 채널을 제작하였다. 80ml의 혈액이 담겨있는 petri dish에 채널의 끝부분을 담가 올라간 높이를 측정하는 실험을 수행하였다. 먼저 채널의 형상을 구부러지게 하여 이에 의한 영향이 있는가를 살펴보고, 채널의 폭을 변화시키고 모양을 달리하여 어떤 영향을 미치는가를 조사하였다.

2. μ -diffuser의 설계, 제작 및 분석

디퓨저는 채널 입출구의 형상변화를 이용하여 미소채널 내 유체의 압력을 회복 혹은 감소시켜줌으로서, 유체의 흐름을 용이하게 하거나 방향조절을 가능케 한다⁷⁸⁾. 치수가 큰 디퓨저에 대해서는 여러 형상에 관한 성능식이 실험적으로 얻어져 있다. 그러나 미소영역에서 유체거동은 일반적 유체이론으로 해석이 매우 힘들뿐 아니라 새로운 이론의 적용을 요구한다. 또한, 극소량 유체의 물성 및 상호작용에 따라서도 디퓨저의 형상 및 성능이 영향을 받는다. 그러므로 본 연구에서는 μ -diffuser의 성능에 영향을 미치는 인자들을 결정하기 위해 기존 실험식을 바탕으로 (그림 3-5-3)과 같은 6종의 기본 형상에 대해 각각 크기가 다른 4가지 디퓨저 (총 24종)를 설계, 제작하였으며, 현재 미소영역에서의 μ -diffuser의 성능을 분석하고 있다.

총 6 종류의 μ -diffuser 각각에 대해 4가지 크기, 즉, 24가지 μ -diffuser를 설계, 제작하였으며 μ -diffuser의 형상 및 크기는 (그림 3-5-3)에 도시한 바와 같다.

3. μ -actuation 원리 연구와 미소 소재의 물성 측정 및 실험

(1) 열공압형 액추에이터의 제작 및 성능시험

열공압형 액추에이터의 기본적인 작동원리는 (그림 3-5-4)에 도시한 바와 같이 완전히 밀폐된 공동(cavity)내에 열을 가하여 밀폐된 유체를 팽창시킴으로써 공동을 밀봉하고 있는 박막(diaphragm)이 변형하도록 하는 것이다. 이러한 형태의 열공압형 액추에이터를 설계하기 위해서는 그 핵심 구성요소인 박막의 거동과 열공압형 액추에이터의 작동원리에 대한 이론적 해석이 선행되어야 한다.

먼저, 박막의 거동에 대해서 살펴보면, 경계 조건(boundary condition)이 고정단(fixed-edge)이며, 가해지는 힘(load)이 분포하중인 평평한 원형 박막(circular flat diaphragm)의 대변형 거동에 대하여 힘과 변형의 관계(load-deflection relation) 및 응력과 변형의 관계(stress-deflection relation)를 각각 다음과 같이 정리할 수 있다.

$$\frac{Pa^4}{Eh^4} = K_1\left(\frac{y}{h}\right) + K_2\left(\frac{y}{h}\right)^3 \quad (1)$$

$$\frac{\sigma a^2}{Eh^2} = K_3\left(\frac{y}{h}\right) + K_4\left(\frac{y}{h}\right)^2 \quad (2)$$

여기서, K_1 과 K_3 은 소변형 굽힘 효과(small deflection bending effect)를 나타내는 상수(coefficient)이며, K_2 와 K_4 는 대변형 인장효과(large deflection stretching effect)를 나타내는 상수이다.

한편, (그림 3-5-4)의 열공압형 액추에이터를 단순화시킨 열역학적 모델로부터 유사 전자회로모델을 얻고, 이로부터 구한 공동내 유체의 온도 특성은 다음과 같다.

$$T_1 = T_{surr} + \frac{R_{12}R_2}{R_{11} + R_{12} + R_2} Q \left(1 - e^{-\frac{R_{11} + R_{12} + R_2}{(R_{11} + R_2)R_{12}C_1} t}\right) \quad (3)$$

여기서, Q 는 입력 전력을 나타내며, R_{11} , R_{12} 와 R_2 는 열저항을, C_1 은 팽창물질의 열용량을 나타낸다. 또, T_1 과 T_{surr} 는 각각 팽창물질과 주위환경의 온도를 나타낸다. 식 (3)에서 얻은 팽창물질의 온도를 이용하여 공동내의 압력을 구하고 그 값을 식 (1)과 (2)에 대입하면 열공압형 액추에이터의 입력 전력과 출력 값인 박막의 변형량과의 관계를 얻어 낼 수 있다.

이상과 같이 해석된 결과를 바탕으로 하여 (표 3-5-1)과 같은 재질과 치수를 가지는 열공압형 액추에이터를 설계, 제작하였다.

표 3-5-1. 열공압형 액추에이터의 재질 및 치수.

구성요소	재질	치수
박막 (diaphragm)	Beryllium Copper	1cm radius, 150 μ m thickness
공동 (cavity) 및 팽창물질 (Expansion Fluid)	FC-72 (C ₆ F ₁₄)	150 μ m height
열선 저항 (resistor heater)	Tantalum	45 Ω , 500 \AA thickness
전기적 연결선 (Interconnection Pad)	Aluminium	3000 \AA thickness

(2) 전자기형 액추에이터(Electromagnetic actuator)의 제작 및 성능시험

전자기적으로 구동되는 미소펌프의 구동특성을 확인하기 위한 기초실험으로서 구리박막을 이용한 미소빔을 설계, 제작하였다(그림 3-5-5). 미소빔의 재료는 전해도금을 이용한 구리박막이며, 길이(l)를 변화시킨 총 2종의 액추에이터 (표 3-5-2)를 제작하였다. 이러한 미소빔의 구동을 통해 로렌즈 원리에 의해 작동하는 미소빔 액추에이터의 공진주파수를 진공상태에서 측정하고, 액추에이터의 정·동적 성능실험을 하고자 한다.

또한 사용된 구리박막의 영계수와 잔류응력을 블리스터 장치로 측정하였다. 즉, 미소박막재료의 기계적 물성치 측정을 위하여 블리스터 시험용 시편(그림 3-5-6)을 제작하였고, 시험을 통해 영계수 및 잔류응력을 측정하였다.

블리스트 시험용 박막의 변형식은 다음과 같다.

$$\frac{Pa^2}{dt} = 3.41\sigma + 1.37(1.446 - 0.427\nu)\frac{E}{1-\nu}(d/a)^2$$

여기서 P 는 박막에 가해진 압력, d 는 박막의 중심에서 변형량, a 는 박막의 크기, σ 는 구리박막에 걸리는 잔류응력, E 는 구리의 영계수(Young's modulus) 그리고 ν 는 구리의 프와송비(Poisson's ratio)를 각각 나타낸다.

한편 진공상태에서 측정된 박막의 공진주파수는 다음의 식과 같이 근사화된다.

$$fr = \frac{22.4}{2\pi} \sqrt{\frac{Ew^2}{12\rho l^4}}$$

여기서 w 는 미소빔 폭, l 은 길이 그리고 ρ 는 구리재료의 밀도를 각각 나타낸다.

제작된 미소빔의 전자기 구동을 다음과 같이 실시하였다.

- 1) 동특성 시험 : 공기 댐핑이 존재하는 대기 중에서 주파수변화에 따른 미소빔의 동특성 실험
- 2) 정특성 시험 : 물 속에서 인가전류에 따른 미소빔의 정적처짐변화 측정

표 3-5-2. 설계 및 제작된 미소보의 크기.

시편	길이(l) [μm]	폭(w) [μm]	두께(t) [μm]
# 1	1000	30	9
# 2	1200	30	9

4. Micro-channel/duct 설계, 제작 및 성능 시험

미소 펌프에 사용 가능한 가장 간단한 밸브로서 미소 디퓨저(그림 3-5-7)를 고려하였다. 디퓨저가 미소 유동의 방향성을 주기 위한 valve로서 사용되는 경우 지금까지의 연구는 주로 디퓨저의 정적 유동특성에 대해서만 연구가 되어왔다. 그러나 실제 pump에서는 압력이 빠르게 변화되는바 diffuser에서의 동적 유동특성에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 디퓨저의 동적 유동특성 중에서도 특히 동일한 전압 하에서의 주파수 응답특성을 알아보았다. 주된 변수가 diffuser neck-width라고 판단이 되는바 주파수 변화에 따라 boundary layer의 두께가 변화가 되며 그 값이 diffuser neck-width의 1/2이 되는 경우 부터 diffuser를 설계(그림 3-5-8), 제작(그림 3-5-9)하였으며, 이를 압전형 액추에이터와 결합하여 유동시험을 실시하였다.

5. Micro-pump/actuator의 설계, 제작 및 성능 시험

(1) Piezoelectric actuation을 이용한 Micro-pump의 설계, 제작 및 성능 시험

사용 가능한 미소 구동원리 중 큰 힘을 가지며 높은 주파수에서 구동이 가능한 piezo electric 구동방법을 사용하여 pump를 제작하였으며 주파수 변화에 따른 유량을 측정하였다. piezo electric actuator의 경우 구동거리는 전압과 비례하며 구동은 $100V_{p-p}$ 까지 하였다.

(2) Micro-pump를 위한 electromagnetic actuator의 설계, 제작 및 성능 시험

전자기 구동방식의 경우 자기장 \vec{B} 내에 있는 코일에 전류 i 를 공급할 경우 발생하는 전자기력 \vec{F} 는 식 (4)로 표시된다.

$$\vec{F} = \int d\vec{F} = \int i d\vec{l} \times \vec{B} \quad (4)$$

이때 발생하는 전자기력 중 박막에 수직인 방향(z-direction)의 성분만이 박막을 구동하

는데 사용되며, 평면코일 반경방향의 자기장분포가 축대칭이므로 실제 유체 이송에 사용되는 박막 구동력은 평면코일 중심에서부터의 반경방향 거리의 함수가 된다.

한편, Rayleighs의 방법을 사용하면 운동에너지와 위치에너지의 개념으로부터 박막의 공진주파수를 구할 수 있다. 여기서, 운동에너지는 박막의 질량과 관계가 있는 값이며, 위치에너지는 변형에너지와 관계된 값이다. 즉, 자중에 의한 정적 변형에 근거한 변형에너지로부터 박막의 공진주파수⁷⁹⁾는 다음과 같이 표현 될 수 있다.

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{g}{\delta_s}}$$

여기서, g 와 δ_s 는 각각 중력 가속도와 자중에 의한 정적 변형을 나타낸다.

박막재료의 기계적 강도와 붕소 확산 공정의 공정 조건을 고려하여 박막의 두께는 $5\mu\text{m}$ 로 결정하였다. 한편, 실리콘 박막을 사용하는 마이크로펌프에 관한 이전의 연구⁸⁰⁾⁸¹⁾를 살펴보면, 챔버의 부피와 한번의 행정(stroke)에서 펌핑되는 유체의 부피사이에는 $0.625 \times 10^{-3} \sim 6.25 \times 10^{-3}$ 범위의 비를 가지는 것을 알 수 있으며, 이 비는 실리콘 박막의 크기에 관계되어 있다는 것을 고려하여, 박막 한 변의 길이의 반인 a 를 2mm 로 결정하였다. 또한, 박막의 크기가 $4\text{mm} \times 4\text{mm}$ 인 점을 고려하여, 자석의 크기는 지름이 5mm , 높이가 5mm 로 각각 결정하였으며, 박막의 변위를 측정하기 위하여 상부 자석에 반지름이 1mm 인 구멍을 내었다.

다음으로 상부 자석의 구멍크기에 맞도록, 코일의 안쪽 반지름은 1mm 로 하였다. 코일의 바깥쪽 반지름은 사각박막의 변형형태가 거의 원형을 유지할 수 있도록 1.5mm 로 결정하였다. 전체 코일의 길이를 최대로 하기 위해서, 코일의 폭과 코일과 코일사이의 간격을 에멀전 마스크(emulsion mask)의 최소 선폭인 $25\mu\text{m}$ 로 결정하였다. 또한, 코일의 단면을 최대로 하기 위해서, 재현성 있는 전기도금 구조물의 두께인 $30\mu\text{m}$ 를 코일의 높이로 결정하였다.

제작된 미소 전자기형 액추에이터에 대한 정적 및 동적 성능시험을 수행하였으며 이를 통하여 구동특성을 실험적으로 분석하였다.

[연구 결과 및 고찰]

1. 혈액 물성(표면장력, 밀도)의 실험적 측정 및 분석

미소량의 bio-fluid를 이송시키기 위한 pump설계 기초연구로서 열공압 방식과 전자기 방식의 마이크로 액추에이터를 설계, 제작하여 기본 구동 특성을 시험하고 분석하였다.

먼저 혈액의 부피와 질량을 측정하고 혈액의 밀도를 산출하였고, Viscosity는 Ostwald 법에 의하여 세 번의 반복실험을 평균하여 결과를 구했다. 이 결과를 이용하여 Absolute viscosity를 계산하였다. 그리고, (그림 3-5-1)과 같은 방법으로 Contact angle을 측정하였으며(표 3-5-3), 이를 이용하여 표면장력을 (표 3-5-4)와 같이 구하였다.

표 3-5-3. 혈액의 물성치.

Density	1084 kg/m ³
Kinematic viscosity	1.788×10^{-6} m ² /s
Absolute viscosity	1.938×10^{-3} kg/m·s
Contact angle	20°

표 3-5-4. 혈액의 표면장력.

모세관 직경	혈액이 올라간 높이	표면장력
0.5 mm	1.55 cm	0.022 N/m
0.5 mm	1.15 cm	0.016 N/m
0.5 mm	1.8 cm	0.025 N/m
1.0 mm	0.6 cm	0.017 N/m

마이크로 채널에 관한 실험에서는 그림 3-5-10(b), (c), (d)의 경우. 길이 3~4cm 되는 채널의 끝까지 혈액이 도달하였다. 그러나 채널의 폭을 달리한 실험(그림 3-5-10(a))에서는 폭이 넓을수록 혈액이 더 높이 올라가는 결과를 보였는데 이는 기존의 모세관 현상과는 반대 현상이다. 이것은 아주 중요한 문제로 미소영역에서는 채널 내에서 점성이나 다른 요인에 의한 저항이 중요하게 작용한다고 예측할 수 있다. 그림 3-5-10(c), (d)등 몇몇 채널에서는 혈액이 막혀서 더 이상 올라가지 않았다. 이는 아마도 마이크로 채널 제작공정시에 발생하는 문제점으로 채널내의 표면이 깨끗하지 않았기 때문이라고 생각된다. 그리고 혈액의 높은 점성 때문으로 3~4cm의 짧은 길이를 올라가는 데도 10초 이상의 시간이 소요됨으로써 실제 바이오칩에 모세관현상의 응용가능성은 희박하다. 그러나 실제 혈관 속을 흐르는 혈액에 대해서 사용한다고 생각할 때 혈관내의 압력을 고려하지 않았으므로 차후 보충실험이 요구된다.

2. μ -diffuser의 설계, 제작 및 분석

총 24개의 시편(그림 3-5-8)을 제작하였으며 디퓨저 입력단과 출력단을 접합(interconnection)/밀봉 패키징(그림 3-5-11)하여 그림 3-5-12와 같은 장치로 구성하여 실험하였다. 그 결과로 그림 3-5-13과 같은 유동을 얻었으며 이는 diffuser에 의한 유동 방향 선택성을 나타낸다. 그림 3-5-13에서는 50Hz 구동시 평균 $2.4 \mu\text{l}/\text{min}$ 의 유량을 얻었다.

3. μ -actuation 및 property의 측정 및 실험 자료

(1) 열공압형 액추에이터의 제작 및 성능시험

생화학적 유체의 이송을 위한 구동원리로서 열공압 및 열팽창방식과 정전방식은 각각 고온 및 고전계에 의한 이송유체의 손상을 초래할 우려가 있는바, 구동속도는 다소 느리지만 큰 진폭을 얻을 수 있는 전자기형 방식의 펌프를 제작하였다.

열공압형 액추에이터는 미소챔버 내에 미소히터를 제작한 후 팽창물질로 채워 미소박

막으로 밀봉한 것으로, 미소히터에 열을 가하여 이로 인한 팽창물질의 체적변화를 이용해 미소박막을 구동시키는 것이다. 열공압형 액추에이터의 핵심 구성요소인 박막의 변형과 열공압형 구동의 기본원리를 해석하였으며, 이러한 기초 자료를 토대로 하여 액추에이터를 설계, 제작하였다. 시험을 통하여 제작된 열공압형 액추에이터의 성능을 측정하였고 실험 결과와 이론예측 결과를 비교, 검토하였다.

설계, 제작된 열공압형 액추에이터에 대한 이론 예측치(실선)과 실험결과(점선)를 (그림 3-5-14)에 나타내었다⁸²⁾. 그림 3-5-14(a), (b)는 각각 탄탈륨 히터의 저항과 입력 전압을 변화시켰을 때의 박막의 최대 변형량을 나타내는 그래프이며, 이로부터 히터의 저항이 줄어들어 따라서, 또 입력 전압이 증가함에 따라서 박막의 최대변형량이 증가함을 쉽게 알 수 있다. 특히, 그림 3-5-14(a), (b)에서 12V, 133 Ω 의 경우에는 이론적으로 예측한 값과 실제 측정된 값 사이에 큰 차이가 있음을 알 수 있는데, 그 이유는 팽창 물질의 액체상태(liquid-state)에서의 압력의 증가량을 무시했기 때문이라고 생각되며, 실제로 이 값을 이론적으로 예측하는 것은 어렵다. 또한, 이때 팽창물질의 온도가 대기압 상태에서의 끓는점에 매우 가까운 값으로 계산되어지며, 그러므로 액체상태에서의 압력증가를 무시한 효과가 가장 크게 나타나는 경우라고 할 수 있겠다. 그리고, 이때의 실제 측정값인 200 μm 는 팽창물질의 액체상태에서의 압력의 증가로 인해서 발생한 박막의 변형량이라고 할 수 있겠다.

이상과 같이 제작된 열공압형 액추에이터의 박막의 최대 변형량은 45 Ω 의 히터 저항에 12V의 직류전압을 가할 경우 약 400 μm 로 나타났다. 또한, 마이크로머신 기술로 만들어지는 이러한 작은 구조물에 있어서는 입력 열량의 많은 부분이 전도(conduction)에 의해서 손실되어지는 것을 알 수 있었으며, 열공압 효율을 높이기 위해서는 이러한 전도에 의한 열손실을 보다 효과적으로 막을 수 있는 방법이 고안되어야 할 것이다.

(2) 전자기형 액추에이터(Electromagnetic actuator)의 제작 및 성능시험

전자기형 액추에이터는 전자장 내의 박막에 전류를 흘릴 때 발생하는 Lorentz force를 이용하여 박막을 구동시키는 것이다. 전자기구동 펌프의 제작가능성을 시험하기 위한 미소빔 액추에이터를 제작하였고 성능예측 및 설계에 필수적인 구리박막재료의 기계적 물성치인 영계수와 잔류응력을 측정하였다. 또한 미소펌프로서의 응용가능성을 확인하기 위해 미소빔 액추에이터의 성능을 공기 및 물 속에서 각각 시험하였다.

전해 도금된 구리 박막재료의 영계수는 60.38GPa로 측정되었으며 이는 일반구리재료의 영계수에 비해 반에 불과함을 알았다. 또한 잔류응력의 크기는 58.65MPa, 공진주파수는 진공 중에서 주파수를 스위핑(sweeping)한 결과 각 시편의 경우에 대해 26-37kHz 범위에 있음을 알 수 있었다.

또한 동적구동시험을 통해 대기 중에서 미소빔 액추에이터의 공진주파수가 22-36kHz대로 정되었으며 이는 공기의 점성감쇠 영향으로 인해 진공 중에서 측정된 공진주파수에 비해 떨어짐을 알 수 있었다. 측정결과는 (그림 3-5-15)에 도시하였다.

한편 정특성 시험에서는 전류의 변화에 따른 미소빔 구조물의 정적변형을 측정하기 위해 빔에서 발생하는 열에 의한 영향을 무시할 수 있도록 물 속에서 측정하였으며, 그 결과는 (그림 3-5-16)에서 도시하였듯이 선형 탄성거동으로 가정된 빔 이론과 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

4. Micro-channel/duct 설계, 제작 및 성능 시험

마이크로 프로세싱공정을 이용하여 4가지 형상의 diffuser를 제작하여 구동전압을 변화시키면서 압력차와 유동량을 측정하였다. 이에 동일한 압력차에서의 주파수 응답특성을 알아보았다.

미소 디퓨저 제작을 위한 첫 단계로서 실리콘 산화막을 기르며 이를 패터닝하여 RIE의 마스크로 사용한다. diffuser의 부분은 노광전사와 RIE를 통하여 제작되며 질화막을 기른 후 KOH 에칭을 통하여 연결부분을 만들게 된다.

diffuser부분의 정의와 외부와의 연결을 위하여 유리가 필요하며 유리는 레이저 가공을 통하여 가공된다. 가공후 양극접합에 의하여 diffuser와 접합이 된다. 펌프의 박막으로서 폴리머 필름이 사용되며 이는 에폭시수지로서 유리와 접합이 된다.

박막을 구동하기 위하여 piezo electric actuator를 사용하며 이는 폴리머 필름과 접합된다. 또한, 관이 유리의 구멍과 접합이 되어 물을 흘리게 된다. 관의 물의 길이의 변화로서 유량을 측정할 수 있게 되며 압력의 변화는 압전형 압력센서에 의하여 측정하였다.

5. Micro-pump/actuator의 설계, 제작 및 성능 시험

(1) Piezoelectric actuation을 이용한 Micro-pump의 설계, 제작 및 성능 시험

Piezoelectric actuation는 높은 주파수에서 구동이 가능하며 강한 힘을 발휘하는 piezoelectric actuator를 이용하여 펌프를 제작 실험하였다. piezoelectric actuator를 이용한 펌프의 제작 실험 결과 100V_{p-p} 정현파로 구동이 되는 경우 그림 3-5-13에서 보는 바와 같이 50Hz에서 최대유량이 나타났으며 유량은 2.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 이 되었다.

(2) Micro-pump를 위한 electromagnetic actuator의 설계, 제작 및 성능 시험

본 연구에서 제안하는 전자기형 마이크로 액추에이터는 p+실리콘 박막 위에 평면형 구리 코일이 전기 도금된 코일판과 한 쌍의 영구자석으로 구성되어 있다.

그림 3-5-17은 p+실리콘 박막과 코일의 제조 공정을 나타낸 것으로, 520 μm 두께의 4인치 (100)방향의 실리콘 웨이퍼를 기판으로 사용하였다. 먼저, 그림 3-5-17(a)에서는 1100°C에서 9시간 동안 붕소 확산 공정을 수행함으로써 p+실리콘 박막을 정의하였으며, 전기적 절연층과 뒷면 etching공정의 마스크층으로 사용하기 위하여 2500Å 두께의 LPCVD 실리콘 질화막을 형성하였다. 다음으로, 그림 3-5-17(b)에서는 4mm×4mm의 실리콘 박막형성을 위한 식각창(etch window)을 형성하기 위하여, RIE 공정을 이용하여 실리콘 질화막을 패터닝하였다. 그림 3-5-17(c)에서는 전기도금을 위한 seed layer로써 200Å/1200Å 두께의 Cr/Cu층을 형성하였으며, 그림 3-5-17(d)에서는 두꺼운 PR을 형성한 후 사진작업을 거쳐서 고단면비 전기도금 몰드(mold)를 형성하였다. 다음으로, 구리를 전기 도금한 후 seed layer인 Cr/Cu를 식각하고, EDP용액을 사용하여 뒷면에서부터 실리콘을 식각함으로써, 그림 3-5-17(e)와 같은 사각박막과 코일의 제조공정을 완료하였다. 그림 3-5-18은 제작된 마이크로 액추에이터를 위에서 본 사진이다.

S0과 T1의 두가지 자석배치에 대하여 제작된 마이크로 액추에이터의 전자기 구동 진폭을 측정하였으며, 측정은 민감도(sensitivity) 20 $\mu\text{m}/\text{V}$, 분해능(resolution) 0.08 μm 로 행하여졌다.

그림 3-5-19는 자석배치 S0의 경우 전자기형 마이크로 액추에이터의 주파수 응답특성을 나타내고 있으며, 이로부터 S0의 공진주파수와 특성인자는 각각 $10.51 \pm 0.06 \text{ kHz}$ 와 45.9 ± 2.1 임을 알 수 있다. 또, T1의 경우에는 각각 $10.51 \pm 0.22 \text{ kHz}$ 와 46.6 ± 3.3 으로 측정되었으며, 이론적 예측치와 비교한 결과를 표 3-5-5에 정리하였다. 한편, 전자기형 액추에이터의 주파수 응답 측정 도중, 낮은 주파수 대역(1~5Hz)에 가진 주파수의 2배가 되는 큰 진폭의 구동이 관측되었다.

S0와 T1의 자석배치의 경우, 코일에 흐르는 전류의 세기를 변화시켜 가면서 마이크로 액추에이터의 진폭을 각각 측정하였으며, 그림 3-5-20과 3-5-21은 전류 세기에 따른 구동 진폭의 변화를 고정된 주파수 10.6kHz에서 측정한 결과이다. S0 (그림 3-5-20)과 T1 (그림 3-5-21)을 비교해 보면, S0이 T1 보다 더 큰 진폭을 발생하는 것으로 측정되었다. T1의 경우 자기장 분포를 시뮬레이션(simulation)해 본 결과(그림 3-5-22), 이러한 현상은 자석의 구멍으로 인해 코일이 구멍이 있는 자석 쪽으로 갈수록 자기장의 세기가 급격히 줄어드는 데서 기인한 것으로 분석할 수 있다.

또한 그림 3-5-22에서 알 수 있는 바와 같이, 두 자석의 가운데에서부터 구멍이 없는 자석 쪽으로는 자기장의 세기가 일정하다는 점에 근거하여, 구멍이 없는 자석의 위치를 $450 \mu\text{m}$ 만큼 박막 쪽으로 이동시킨 다음 다시 실험을 수행하였다. 이 실험으로부터 그림 3-5-23에 나타나 있는 바와 같이, T1이 S0보다 AC 전류 26.8mA에서 2.4배정도 더 큰 진폭을 나타냄을 확인하였다.

표 3-5-5. Electromagnetic actuation characteristics of the fabricated microactuator

Magnet composition	Resonant frequency [kHz]	Quality factor	Peak-to-peak amplitude at resonance [μm]
S0	10.51 ± 0.06	45.9 ± 2.1	1.8*
T1	10.51 ± 0.22	46.6 ± 3.3	4.4**

* measured at the rms AC current of 25.5 mA

** measured at the rms AC current of 26.8 mA

제 6 절 다중 센서 신호 처리에 관한 연구

[연구 개발 방법]

1). 다중센서신호처리

특정 센서는 몇 종류의 물질만을 감지할 수 있다. 실제 혈액 중에는 여러 가지 물질이 포함되어 있으므로 각각의 물질들을 감지하려면 여러 개의 센서가 필요하다. 각각의 센서들로부터 나온 신호를 처리하기 위해서는 특별한 프로세서가 필요하며 이것은 여러 가지 방법으로 구현될 수 있다. 이 프로세서의 역할은 입력으로 들어오는 센서 신호들을 종합하여 혈액이 어떤 종류의 물질들을 포함하고 있는가를 판단하는 것이다. 즉 패턴인식기의 역할을 한다.

2) 신경회로망을 이용한 다중센서프로세서

신경회로망이란 뇌에서 이루어지는 신호처리방식을 모형화한 것이다. 이것은 기존에 많이 쓰이던 통계학적인 방법이나 선형시스템을 이용한 패턴인식기에 비해 다음과 같은 장점이 있다. 83)

- 비선형성: 보통 패턴인식기를 설계할 때는 정확한 수학적 해석이 선행되어야 하기 때문에 보통 선형 시스템으로 모형화한다. 그러나 신경회로망은 비선형 특성으로 모형화된 것이기 때문에 기존의 선형시스템에서 발생할 수 있는 근사화 오차를 줄일 수 있다.
- 학습기능: 입력과 출력 패턴들이 주어지면 신경회로망이 학습을 하고 학습되지 않은 패턴이 들어올 경우에도 학습된 정보를 통해 적절한 출력을 내 보내는 연상 기능을 갖는다. 이것은 주어진 환경이 바뀌어도 시스템 자체는 크게 변경시킬 필요가 없다는 것을 의미한다. 즉 환경에 대한 적응성이 뛰어나다.
- 하드웨어 구현의 용이성: 신경회로망은 단순한 기능을 하는 셀들을 많이 연결시켜 복잡한 문제를 풀 수 있도록 한 것이기 때문에 하드웨어로 만들기 쉽다. 또한 하드웨어를 만드는 공정 중에 이론적인 모형과 오차가 생겼을 경우에도 학습 기능에 의해 보상될 수 있다.
- 바이오센서와의 결합성: 본 과제의 최종적인 결과는 바이오센서와 생물전자소자를 결합시킨 형태의 바이오칩이다. 생물전자소자를 이용해 프로세서를 만들려면 간단한 알고리즘으로 처리할 수 있는 것이어야 한다. 신경회로망은 생물의 신호 처리 방식을 모형화한 것이므로 이에 적합하다.

3) 사용된 신경회로망의 구조와 원리

- 다층퍼셉트론 신경회로망: 과제에서 사용한 신경회로망의 모델은 가장 많이 사용되는 다층퍼셉트론(Multi-layer Perceptron)구조의 신경회로망이다. 그 구조는 다음과 같다.

그림 3-6-1 다층퍼셉트론 신경회로망의 구조

그림에서 원은 비선형 함수(뉴런)를 나타내고 원과 원 사이의 연결선은 가중치를 담고 있는 시냅스를 나타낸다. 입력을 $X=(x_1, x_2, \dots, x_p)^t$ 라고 하자. 여기서, P는 입력의 차수이며, 전체 패턴의 수는 N 개이다. 이 때 출력은 다음과 같다.

$$O_k = f_k^o \left\{ \sum_{j=1}^L W_{jk}^o [f_k^h (\sum_{i=1}^P W_{ji}^h x_i + \theta_k^h)] + \theta_k^o \right\}$$

위 식에서 알 수 있듯이 출력은 가중치 W와 뉴런의 비선형 함수 f로 결정된다. 함수 f는 보통 시그모이드함수를 많이 사용한다. 신경회로망의 학습은 결국

이 가중치를 찾아내는 과정이라고 할 수 있다. 본 과제에서는 가장 많이 사용되는 오차역전파방법(Error Back Propagation)에 의해 신경회로망을 학습시켰다. 보다 복잡한 학습 알고리즘이 있지만 VLSI로 구현하기 위해서는 간단해야 하므로 이 방법을 택했다.

신경회로망의 VLSI구조: 본 과제에 사용한 하드웨어는 뉴런칩과 시냅스칩으로 이루어져 있다. 84)

· 시냅스칩의 구조:

시냅스는 두 뉴런 사이를 연결하는 연결고리이며 고유의 가중치를 가지고 있다. 각 시냅스 셀(cell)은 전층의 뉴런에서 오는 뉴런의 활성화 함수(f) 출력값 x 와 역전파 과정에서 다음 층의 뉴런에서 역전파되어오는 보정값(correction term) δ 를 입력으로 갖는다. 출력값은 입력값 x 에 시냅스 가중치가 곱해진 wx 와 보정값에 가중치가 곱해진 $w\delta$ 가 된다. 또 시냅스 내부에서는 역전파되어 온 보정값 δ 와 입력값 x 또 학습률 η 를 이용해서 시냅스 가중치 w 를 갱신 시킨다.

그림 3-6-2 시냅스 셀(Synapse Cell)

시냅스 셀의 덧셈 기능은 전류의 합으로 간단히 구현할 수 있고 곱셈은 길버트곱셈기를 사용한다. 다음 그림은 이러한 회로를 VLSI로 구현하기 위한 layout이다. 시냅스칩은 250개의 시냅스셀과 아날로그지연기(Analog Delay Line)로 이루어져 있다. 시냅스칩을 병렬로 연결함으로써 시스템의 크기를 조절할 수 있다. 아날로그지연기는 연속적으로 들어오는 입력을 병렬로 변환시켜주는 장치이다.

그림 3-6-3 시냅스셀의 layout

· 뉴런칩의 구조:

뉴런칩은 시냅스로부터 전달되어 온 신호를 합해서 활성화 함수를 통과시키는 기능을 한다. 각 뉴런 셀(cell)은 앞 층에서 나온 각 시냅스 출력의 합 ($= \sum w\delta$)과 다음 층에서 거꾸로 들어오는 오차값($= \sum w\delta$)들을 입력으로 받는다. 또 시그모이드 활성화 함수를 통과한 앞 층의 시냅스 전달값 o 와 역전파되어 시냅스 가중치 값 갱신에 사용되는 보정값(correction term) δ 를 출력한다.

그림 3-6-4 뉴런 셀(Neuron Cell)

뉴런의 내부는 시그모이드 활성화 함수 회로와 시그모이드 함수의 미분함수 그리고 한 개의 곱셈기로 이루어져 있다. 곱셈기는 역전파된 오차와 시그모이드 미분값의 곱을 구하기 위해 사용된다. 다음은 시그모이드함수와 시그모이드미분함수를 구현하기 위한 회로이다.

그림 3-6-5 시그모이드회로

그림 3-6-6 시그모이드미분함수회로

다음은 이러한 뉴런셀을 layout한 그림이다.

그림 3-6-7 뉴런셀의 layout

4) 신경회로망 보드

뉴런칩과 시넵스칩을 이용해 간단한 패턴인식 문제를 풀 수 있는 신경회로망 보드를 제작하였다. 입력 100개, 출력 10개의 패턴인식문제를 풀 수 있는 시스템이며 자체적으로 학습이 가능하다. 문제의 종류에 따라 학습 속도가 달라지겠지만 신경회로망을 통과하는데 걸리는 시간이 약 16usec이므로 한 패턴에 대해 5000번의 반복을 통해 학습을 한다면 대략 80msec 정도의 시간이 소요된다.

그림 3-6-8 신경회로망 보드의 사진

[연구 결과 및 고찰]

1). 연구 결과

가. 1차년도 연구 결과

- 몇 개의 센서로부터 들어오는 아날로그신호를 받아들여 적절한 클래스로 구분짓는 패턴인식 기술에 대한 연구
- 신경회로망을 이용한 패턴인식기술의 가능성 연구: 기존의 아날로그 신경회로망칩을 이용해서 패턴인식 시스템을 만들 수 있는지에 대한 가능성 검토
- 아날로그 신경회로망칩의 한계와 개선방향에 대한 연구

XOR문제: 신경회로망의 성능을 간단히 평가할 수 있는 문제로 XOR 문제가 있다. 즉 두 개의 입력과 하나의 출력으로 이루어진 XOR 문제를 신경회로망으로 풀 수 있는 가를 보는 것이다. 신경회로망의 성능을 검증하기 위해 먼저 신경회로망칩을 이용하여 XOR문제를 풀어 보았다.

x	y	x XOR y
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	0

[XOR문제의 두 입력과 출력]

이 패턴은 선형적으로는 분리할 수 없는(Linearly Non-separable) 전형적인 패턴인식 문제이다. 이 문제는 다층퍼셉트론을 사용하면 분리가 가능하다.

그림 3-6-9는 XOR문제에 대한 출력 파형을 찍은 것이다. 3개의 채널을 동시에 보여주고 있다. 첫 번째 채널은 첫 번째 입력을, 두 번째 채널은 두 번째 입력을 각각 나타내고 세 번째 채널은 그 결과를 보여 준다. 앞에서 제시한 XOR문제의 입출력표와 일치하는 것을 확인할 수 있다. 이것은 아주 간단한 경우이지만 보다 복잡한 문제도 그 구조를 확장함으로써 풀 수 있다는 것이 이론적으로 알려져 있다.

그림 3-6-9 XOR문제의 출력 파형

나. 2차년도 연구 결과

- 기존의 아날로그 신경회로망칩의 단점을 보완한 새로운 구조의 신경회로망칩에 관한 연구
- 다중센서신호처리 시스템의 개발 (기존 신경회로망칩을 이용한 PCB보드의 제작)

Wine 문제: 본 과제에서 수행하려는 것은 혈액 내의 성분을 분석하여 질병을 진단하는 것이다. 그러나 아직 혈액 내의 성분을 감지할 수 있는 바이오센서가 개발되지 않아 직접 실험할 수는 없다. 그래서 벤치마크자료를 이용해 칩의 성능을 검증하려고 했다. 그 중 가장 비슷한 것으로 와인을 이루는 물질의 성분에 따라 그 와인의 종류를 결정하는 문제를 실험에 사용하였다. Wine문제는 아래와 같이 총 13 종류의 입력을 가지며 그 혼합 정도에 따라 3가지 종류의 와인으로 분류하는 문제이다.

1. Alcohol
2. Malic acid
3. Ash
4. Alcalinity of ash
5. Magnesium
6. Total phenols
7. Flavanoids

8. *Nonflavanoid phenols*
9. *Proanthocyanins*
10. *Color intensity*
11. *Hue*
12. *OD280/OD315 of diluted wines*
13. *Proline*

그림 3-6-10 는 실험에 사용된 신경회로망의 구조를 보여준다.

그림 3-6-10 wine문제에 사용된 신경회로망의 구조

입력은 아날로그 값을 가지며 출력은 'high' 와 'low'의 두 가지 값을 가진다. 은닉층의 뉴런은 모두 6개이다.

그림 3-6-11은 Hspice 시뮬레이션 결과이다. 각각의 패널은 출력값의 변화와 목표값을 나타낸다. 마지막 패널은 학습기간과 연상기간을 구별하기 위한 신호이다. $30\mu s$ 까지는 학습이 이루어 지고 그 이후는 연상(recall)이 이루어지고 있다. 수십 μs 가 지나면 출력값이 목표값을 따라가는 것을 볼 수 있다.

그림 3-6-11 Wine문제의 Hspice 시뮬레이션 결과

2) 연구 고찰

앞에서 Wine문제를 하드웨어로 실험하지 못한 이유는 학습되는 과정에서 생기는 시냅스의 가중치 변화를 기억할 수 있는 메모리에 대한 연구가 2차년도까지 충분히 이루어지지 않았기 때문이다.

아날로그 신경회로망에서 가장 중요한 것은 곱셈기의 성능이다. Hspice를 이용한 시뮬레이션에서는 비교적 정확한 곱셈기의 특성을 얻을 수 있었지만 실제 칩을 만들어 실험해 보면 그 특성이 상당히 왜곡되는 것을 볼 수 있었다. 이것은 칩을 만드는 과정에서 발생하는 공정상의 문제 때문이다. 따라서 칩을 설계할 때는 이러한 왜곡에 둔감하도록 만들어야 한다.

또 다른 문제는 아날로그회로의 정밀도이다. 학습을 제대로 하려면 최소한 10bit 이상의 정밀도가 필요하다고 알려져 있다. 그러나 기존의 아날로그회로의 정밀도는 7bit정도 밖에 되지 않는다.

위의 두 가지 문제에도 불구하고 시냅스의 수를 시뮬레이션할 때 보다 5~10배 정도 늘려 실제 하드웨어적으로 실험을 해 보면 학습이 되는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 신경회로망의 장점 중에 하나로서 비교적 간단한 셀들이 서로 연합하여 오차를 보정해 주기 때문에 가능하다.

앞으로 더 보완해야 할 연구 내용은 다음과 같다.

- **정밀도:** 디지털의 경우 0 아니면 1 이기 때문에 어느 정도의 오차가 있어도 문제가 되지 않는다. 그러나 아날로그의 경우 잡음이나 제작 과정중의 변이에 상당히 민감하다. 정밀도를 높이려면 회로가 상당히 복잡해지는 단점이 있다. 물론 디지털방식의 신경회로망은 그 정밀도를 원하는 만큼 높일 수 있다. 그러나 이것은 생물전자소자로 구현할 수 없는 방법이고 전력 소모도 클 뿐더러 처리하는데도 많은 시간이 든다.
- **비휘발성 기억장치:** 신경회로망에서는 가중치의 값이 상당히 중요하다. 보통은 커패시터에 전하의 형태로 그 값을 저장하는데 시간이 지남에 따라 전하가 누출되는 현상이 일어난다. 따라서 특별한 기억장치가 필요하다. 커패시터의 값을 읽어 컴퓨터의 기억장치에 저장했다가 적당한 때에 다시 써 주는 방법으로 가중치값을 기억할 수 있다. 그러나 이 방법은 별도의 하드웨어가 필요하기 때문에 적절하지 않다. EEPROM 같은 비휘발성 기억소자를 사용하는 방법이 있으나 아날로그를 디지털로 바꾸는 별도의 회로가 필요하다. 아날로그 형태의 비휘발성 기억소자도 연구된 바 있지만 그 정밀도가 8bit 정도밖에 되지 않는다. 85)

제 7 절 Multi-biosensor를 위한 미세 구조 연구

[연구 개발 방법]

1. 마이크로채널 형성 연구

혈액에 함유되어 있는 특정 단백질이나 포도당을 측정하기 위해서는 혈액 샘플의 이송을 위한 마이크로 채널이 필수적이다. 기존의 미소 채널을 만드는 방법에는 (1) 실리콘 기판에 채널을 위한 홈을 형성한 후 다른 실리콘 혹은 유리 기판을 bonding하는 방식 (2) LIGA 공정을 이용하는 방식 (3) 기판에 채널 모양을 식각한 후 LPCVD 박막을 이용하여 sealing 하는 방식 등이 있다. 이러한 방식들은 채널간의 완전한 절연이 안되거나, 고가의 장비를 필요로 하거나, 하이브리드 형태로 칩에 연결해야만 하는 문제점등이 있다. 86)87)88)

본 연구에서는 마이크로 채널을 형성하기 위하여 새로운 3가지 방법에 대해 연구하였다.

가. 전기화학적으로 실리콘을 식각하여 채널을 형성하는 방법

전기화학적 식각의 원리는 다음과 같다. HNO_3 와 같은 산화제나 F-와 같이 실리콘과 반응하여 용해 화합물(water-soluble complexes)을 형성하는 음이온이 포함된 용액 내에서는 실리콘의 식각 반응이 발생한다. $\text{HF-HNO}_3\text{-H}_2\text{O}$ 로 조성된 용액 내에서 실리콘 기판을 넣고 실리콘 기판과 용액에 각각 양극과 음극을 형성하여 주면 양극에서 실리콘이

식각되는 양극 분해(anodic dissolution)가 일어난다.

이렇게 전류에 의하여 촉진되는 화학적 식각을 전기화학적 식각(electrochemical etching)이라 한다. 실리콘의 양극분해는 정공의 공급이 필요한데, 이는 두가지의 특성을 가진다.

첫째는 식각률을 조절할 수 있다. 정공의 공급이 없으면 실리콘 기판 자체에 형성된 국부적인 전극에 의해 정공이 공급되지만 외부에서 정공을 공급하여 줌으로써 분해 반응을 증가시킬 수 있다. 그러므로 전기화학적 식각에서는 반응 시 가해주는 전류나 선택적 식각률을 조절할 수 있다.

둘째는 기판의 type에 따른 선택적 식각이다. 정공의 공급이 필요하기 때문에 p-type 기판의 식각률이 n-type 기판의 식각률에 비해 월등히 크다. 특히 n-type 기판의 경우 기판의 농도를 바꿈으로써 식각률을 조절할 수 있다.

나. 다공질 실리콘을 이용한 마이크로 채널 형성 방법

실리콘을 불산을 포함하는 전해질에서 전기 화학적인 산화, 분해 반응을 시키면 웨이퍼의 깊이 방향 곧, columnar 구조로 pore가 형성되는 것을 다공질 실리콘(porous silicon)이라고 한다. 다공질 실리콘은 단결정 실리콘보다 표면적이 넓기 때문에 산화되는 속도가 매우 빠르다. 다공질 실리콘의 이러한 특성을 이용하여 마이크로 채널을 형성하는 방법에 대해 연구하였다.

실리콘의 양극화 반응은 불순물의 종류 및 농도에 따라 다르다. 즉, p-type이 n-type보다, 고농도의 p-type (p+) 이 저농도의 p-type (p-) 보다 다공질화가 빠르게 된다 89). 그림 3-7-1(a)에서처럼 p+ 와 p- 기판을 같은 조건에서 각각 다공질화를 하면 다공질화 속도는 p+ 기판이 3배 가량 빠르지만, 그림 3-7-1(b)에서처럼 p+ 와 p-을 같은 기판에 형성한 후 다공질화를 하면 p+가 p-보다 100배 이상으로 빠르게 됨을 실험으로 확인하였다. 이러한 성질을 이용하여 p- 기판에 붕소와 인의 확산 깊이가 각각 2.5 μm , 0.7 μm 가 되도록 이중 확산을 하고 다공질화를 하면 인 확산된 영역은 선택적으로 다공질화가 되지 않고 붕소 확산된 영역 (p+)은 기판 (p-)보다 100배 이상 빠르게 다공질화가 되어 웨이퍼의 깊이 방향보다 수평 방향으로 먼저 다공질화가 된다. (그림 3-7-2) 수평 방향으로 다공질화 된 다공질 실리콘을 0.1% KOH용액으로 제거하면 모노리딕 미소 채널을 만들 수 있다.

불순물의 종류 및 농도에 따른 다공질화 속도의 차이를 전압에 대한 전류 밀도의 차이로 관찰하였다. 그림 3-7-3에서처럼 동일 전압에 대해 p-type이 n-type 보다 불순물 농도가 높을수록 전류 밀도가 크기 때문에 곧, 정공의 공급이 원활하기 때문에 빨리 다공질화를 관찰할 수 있다.

제작된 미소 채널의 두께는 붕소 확산의 확산 깊이에 의해 결정되며, 미소 채널의 모양은 확산 마스크에 의해 결정됨으로 임의의 모양이 가능하다. post-CMOS 공정이 가능하다. 모노리딕 방식이며 미소 채널간에 완전한 절연이 가능한 장점들을 가진다.

그림 3-7-4 는 모노리딕 buried 미소 채널 제작 공정도이다. P-type (100) Si ($\rho = 10-15 \Omega\text{cm}$)를 이용하여 먼저 웨이퍼의 수평 방향으로 다공질화가 일어나게 하기 위한 붕소 확산을 975°C에서 60분간 실시하고 junction depth가 2.5 μm 가 되도록 1100°C에서 60분간 열처리를 한다. 고속 회로 혹은 냉각을 필요로 하는 센서를 제작하기 위한 인 확산을 925°C 25분 하며 이때 junction depth는 0.7 μm 이다.(그림 3-7-4 (a)) (참고, 실제 회로를 만들기 위해서는 n-type epitaxy 층을 기른 후에 회로를 제작한다.) 다공질화는

전해질 HF:C₂H₅OH=1:1 (부피비), 전류 밀도 J=20 mA/cm²로 10분 동안 한다. (그림 3-7-4 (b), (c)) 0.1% KOH 용액에서 희생층인 다공질 실리콘을 식각하여 미소 채널을 완성한다. (그림: 3-7-4 (d))

다. 후막 감광막(thick photoresist)을 이용한 삼차원 mold 제작과 전기도금을 이용한 채널 형성방법

Microelectromechanical systems(MEMS)에서 기판위에 금속 구조물을 형성하는 방법으로 두꺼운 감광막(photoresist)을 희생층으로한 전기도금이 널리 이용되고 있는데, 이를 through-mask-plating 기술이라고 한다. 그림 3-7-5와 같이 through-mask-plating 기술은 기판 위에 도금공정을 수행시 필요한 seed 금속을 증착하고, 그 위에 두꺼운 감광막을 coating한 다음 제작된 photomask를 이용하여 반도체 공정의 사진 식각 공정을 통해 몰드를 형성한 다음, 구조체로 쓰일 금속의 전기도금공정을 하고, 감광막과 seed layer를 제거하고 나면 그림처럼 금속 구조물을 얻을 수 있다.⁹⁰⁾⁹¹⁾

본 연구에서는 마이크로채널을 형성하기 위한 또 하나의 방법으로 이 기술을 바탕으로 한 새로운 방법인 Multi-exposure and single development(MESD)를 이용하였다. 본 연구에서 제작하고자하는 마이크로 채널 또한 마이크로 크기의 삼차원 구조물이라 할 수 있는데, 이를 금속 구조물로 제작하기 위하여 두꺼운 감광막과 포토마스크를 이용하여 몇 번의 자외선 노광 공정을 거쳐서, 한 번의 현상과정을 거쳐 간단하게 마이크로 채널에 필요한 몰드를 형성하고, 필요한 금속의 전기도금을 통하여 원하는 마이크로 채널을 제작하는 방법이다 (그림3-7-6).

MESD에서는 두꺼운 감광막에 mold를 형성하는데, 이때 가장 중요한 변수가 자외선의 조사량이다. 그림3-7-7처럼 두꺼운 감광막에 첫 번째로 두꺼운 감광막두께 전부를 노광시키는 high dose로 자외선 조사량을 정하고, 두 번째에서는 감광막의 전체 두께의 일부분을 노광시키는 정도의 low dose로 노광시킨 다음 현상을 하면 그림과 같이 mold를 형성할 수 있다. 여기서 중요한 것이 자외선의 조사량과 development 시간인데 그림3-7-8과 같이 90um 두께의 AZ9262 감광막에 자외선 노광 시간을 변화시키며 현상 실험 결과를 얻었다.

라. 미세전극 구조에 관한 연구

(1) 전기화학적 방식의 포도당 측정

바이오센서(biosensor)란 특정한 신호를 인식하는 센서의 일종으로 신호를 인식하는 부분이 생체 물질이라는 특징을 가진다. 이러한 바이오센서의 개념은 Clark 과 Lyons 들이 효소를 전극에 고정화시켜서 효소 전극을 만들 수 있음을 보고하면서부터 형성되었다.⁹²⁾ 이들은 생체시료에 대한 기존의 분석 작업이 번거롭고 오랜 시간을 필요로 하며 시료의 전 처리를 요하는 등의 단점들을 보완 및 극복하기 위해 간단하고 빠르며 시료의 전 처리를 요하지 않는 분석 장치를 고안하였다. 이후 바이오센서에 관한 연구는 발전을 거듭하여 현재 진단 의약품 아니라, 식품 산업 등으로 그 응용 범위를 넓혀 가고 있다.

분석 장치로서의 바이오센서는 생화학적 신호를 인식하는 생체 소자 부분인 분자식별 소자(biodevice)와 감지된 신호를 우리가 측정가능한 신호로 변화시키는 비 생체 부분인

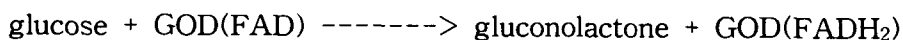
신호변화부분(transducer)으로 구성된다.⁹³⁾

바이오 센서는 분자식별 소자에 따라 구분되어진다. 분자식별 소자에 따라 효소 센서, 면역 센서, 효소면역 센서, 미생물 센서, 조직 센서등 으로 분류된다. 또한 신호변화 부분에 따라 분류될 수 있다. 전류, 전압, 저항 등의 변화를 측정하는 전기화학 센서(electrochemical biosensor), 빛의 변화를 측정하는 발광계측형 센서(optical biosensor), 질량 변화를 주파수의 변화로 변화시켜 측정하는 압전 센서(piezoelectric biosensor), 그리고 생체 물질과의 반응 시 발생하는 온도의 변화를 측정하는 열계측 센서(thermal biosensor)로 분류된다.

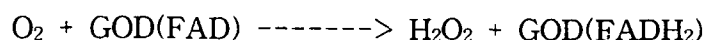
전류 측정법(Amperometry)란 일정한 전위에서 전극에 발생하는 전류를 측정하여 측정하고자 하는 물질의 양을 알아내는 방법이다. 전극의 구조에 따라 그림 3-7-9와 같이 기준 전극(reference electrode)과 작업 전극(working electrode)의 두 개의 전극만을 사용한 two-electrode system 과 위의 두 전극 외에 보조 전극(counter electrode)을 첨가하여 세 개의 전극으로 이루어진 three-electrode system으로 나누어진다. 두 개의 전극만을 사용한 경우에는 전체 구조는 간단하지만 용액내의 전압 강하로 인해 작업 전극의 전위가 일정하게 유지할 수 없는 단점이 있다. 보조 전극을 사용한 three-electrode system의 경우는 발생한 전류 대부분을 기준 전극이 아닌 보조 전극쪽으로 흐르게 함으로써 전류 측정 시에 전압 강하로 인한 전류 손실이 거의 없어 안정된 전위를 얻을 수 있다.⁹⁴⁾ 그러나 수 μm 의 미세 전극을 사용 할 경우에는 작업 전극의 면적이 매우 작고 기준 전극과의 거리가 가까우므로 용액내의 전압 강하가 무시 할 정도로 작아져서 two-electrode system으로 측정이 가능하다. 이러한 전류 측정법은 다른 측정법에 비해 몇 가지 장점들이 있다. 효소를 사용하여 특정하게 유도된 반응을 통해 발행하는 전기 산화 물질을 통해 정확한 신호를 비교적 신속하게 구할 수 있고 다른 분석 방법에서 추가로 요구되는 시약이 불필요하며 측정 장비의 정밀함으로 최소 측정 한계를 낮게 할 수 있다. 그러나 생체 시료를 전류법으로 분석하기 위해서는 과산화수소(H_2O_2)가 전기 산화되어 질 수 있는 충분히 높은 전압을 필요로 하게 되고 이러한 범위에서는 과산화수소 외에 다른 혈액 내에 포함되어진 다른 전기 활성을 갖는 다른 생체물질들이 산화되어 전류를 형성하게 되어 간섭신호가 발생한다. 이러한 간섭 현상을 억제하기 위해 인공 전자 전달체(artificial electron mediator)를 사용하여 낮은 전위에서 측정을 하거나 박막을 전극 표면에 입혀 간섭 물질들이 전극으로의 확산을 막을 수 있다.⁹⁵⁾

본 연구에서는 혈액내의 포도당의 양을 측정하기 위해서 생체 물질로서 효소의 일종인 glucose oxidase(GOD)를 선택했고, 효소 반응의 진행에 따라 발생하는 전류의 양을 측정하는 방식으로 전기화학적 방법을 사용하였다.

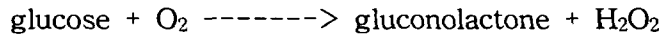
작업전극과 기준전극에서의 반응은 그림 3-7-10.과 같다. glucose oxidase과 포도당의 반응은 다음과 같다.



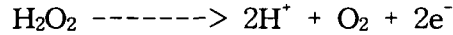
이러한 반응에 의해 생성된 GOD(FADH_2)와 혈액 내의 산소는 다음과 같은 반응을 통해 과산화수소를 생성하게 된다.



결국 전체의 반응은 효소인 glucose oxidase의 감소 없이 다음과 같이 된다.



이 때, 작업 전극과 기준 전극 사이에 양전위를 가하게 되면 위의 반응에서 발생된 과산화수소는 수소 이온과 물로 분해되면서 전자를 내놓게 되고 이로 인해 두 전극 사이에 전류가 발생하게 된다.



이 때 발생하는 전류는 결국 혈액내의 포도당의 양에 비례하게 되므로 우리는 포도당의 양을 측정할 수 있는 것이다.

(2) 미세 전극 및 Multi 전극 구조 형성법 연구

전기화학적 분석에 있어서 미세 전극은 큰 전극에 비해 많은 장점이 있다. 일반적으로 측정하려는 용액은 전기적 저항이 커서 버퍼 이온을 추가하여 측정하게 되는데 미세 전극의 경우 흐르는 전류의 양이 작아져서 전류내의 전압강하가 줄어들어 더욱 버퍼 용액 없이 측정이 가능하고 또한 two-electrode system의 사용이 가능하게 된다. 전류의 양이 적기 때문에 용액 내에서부터 전극으로의 확산이 짧은 시간에 일어나게 되어 용액을 저어(stirring) 줄 필요가 없게 된다. 또 가장자리 효과에 의해 전극표면에 수직하지 않게 흐르는 전류가 전극표면에 수직하게 흐르는 전류보다 더 우세해지므로 상대적으로 더 큰 전류 밀도를 얻을 수 있게 된다.

본 연구에서는 기존의 반도체 공정을 이용하여 수 μm 의 크기를 공정을 갖는 미세 전극을 제작하였다. 본 연구에서는 기준 전극과 작업 전극을 사용하는 two-electrode system을 사용하였다. 일반적으로 기준 전극으로는 표준수소전극(standard hydrogen electrode), 은-염화은 전극(silver-silver chloride electrode)와 칼로멜 전극(calomel electrode)등이 많이 사용된다. 본 연구에서는 은-염화은 전극을 기준전극으로 사용하였다. 은 전극의 경우 선택적인 식각이 힘들기 때문에 lift-off 공정을 사용하여 patterning 하였다. Lift-off 공정은 우선 두꺼운 photoresist를 이용해서 금속이 증착될 부분의 감광막을 제거하고 금속이 증착되서는 안될 부분에는 감광막이 남도록 패턴을 형성하고, 그 위에 thermal evaporator 장비를 이용하여 은을 증착한 후 photoresist를 아세톤을 이용해 제거함으로써 원하는 패턴의 금속 전극을 형성할 수 있는 반도체 공정이다. lift-off 공정을 이용하여 은 전극을 형성하고 그 후에 0.025M 농도의 FeCl_3 용액 속에 일정 시간 놓아둠으로써 염화은을 형성하였다.

작업 전극은 금 전극을 사용하였다. 금 전극의 경우 산화가 잘 되지 않고 반도체 공정으로 쉽게 형성할 수 있다. thermal evaporator 장비를 이용하여 금을 증착한 뒤 photolithography 과정을 거쳐 금 전극을 형성하였다. 이러한 금 전극 위에 전극간의 전기적 절연을 위한 Passivation 층으로 PECVD(plasma enhanced chemical vapor deposition) 장비에서 실리콘 질화막을 형성한 뒤 다시 photolithography 과정을 거쳐서 원하는 크기의 전극을 형성 할 수 있다. photolithography의 경우 반도체 공정의 가장 중요한 과정으로서 현재 $1\mu\text{m}$ 이하의 크기의 패턴도 형성 가능하다. 따라서 이러한 반도체 기술을 사용하므로써 원하는 크기의 미세 전극도 손쉽게 그리고 대량으로 생산이 가능하다.

위와 같은 금속 증착 방법과 liftoff 공정, 사진 식각 공정, 절연막 증착 공정등을 조합하면 multi 전극을 쉽게 형성할 수 있다. 먼저 실리콘 기판 위에 열산화막을 성장시킨 후 working 전극 용 금속을 thermal evaporator에서 전면 증착한 후 사진 식각 공정을 통해 원하는 모양으로 patterning 한 후, 또 다른 금속 전극이 필요한 경우 원하는 pattern으로 liftoff 공정을 통하여 형성할 수 있으며, liftoff 공정을 반복함으로써 몇 가지의 금속 전극을 형성 할 수 있다.

전극의 크기를 작게 함으로 인해 나타나는 단점은 전체 신호 전류가 작아진다는 것인데 이를 해결하기 위해서 전극의 구조를 array로 제작하였다. 작은 신호 크기를 갖는 미세전극을 여러 개 배열함으로써 신호의 증가를 이룰 수 있다. (그림3-7-11)

(3) 미세 전극 구조에 효소 고정화 방법에 대한 연구

본 연구에서 선택한 효소전극 biosensor는 반응에 필요한 효소를 금속 전극 위에 고정화하여야 한다. 본 과제의 1,2차년도에서 선택한 포도당 측정을 위해서는 필요한 효소 GOD를 전극에 고정하는 방법으로 전극사이 전압을 가해주어 용액내의 monomer가 전극 표면에 부착하면서 polymer로 변환되는 electropolymerization 방식을 선택하였다. polypyrrole은 전기전도성을 갖는 polymer로 박막을 형성하기가 쉽고 전극의 표면 상태 관계없이 잘 부착되며 전기 활성을 갖고 물리적으로 여러 가지 조건에서 안정적이다. pyrrole과 GOD가 같이 용해되어 있는 용액 안에 전극을 넣고 작업 전극 쪽에 양전압을 가해 주면 monomer인 pyrrole이 polypyrrole로 되면서 작업 전극 표면에 박막을 형성하게 된다. 이 때, 용액내의 GOD가 polypyrrole 이 형성될 때, 그 사이에 entrapment 되게 된다. 이렇게 형성된 polypyrrole/GOD 막은 그 자체적으로 size-exclusion property를 갖게 되므로 위에서 언급한 간섭 물질의 전극으로의 확산을 억제할 수 있게 된다.(그림 3-7-12)

마. 마이크로채널과 반응 챔버, 전극 구조의 집적화 방법 연구

본 연구에서 목표로 하는 혈액내 특정 단백질 및 포도당을 측정하기 위한 전기화학식 바이오센서에 필요한 미세전극과 마이크로채널을 비롯한 미세구조물의 집적화 방법에 대해 연구하였다.

혈액분석을 위한 센서에서의 중요한 목적 중에 하나가 혈액 채취시에 환자가 느끼는 통증을 최소화하는 것이다. 이를 위해서는 혈액 채취에 필요한 바늘의 크기도 작아야 하며, 채취된 샘플의 양이 작으므로 샘플이 미세전극과 반응하는 반응 챔버도 또한 작아야 한다. 마이크로 채널과 더불어 이러한 구조물을 미세전극과 함께 집적화하는 방법으로 본 연구에서는 앞에서 설명한 마이크로채널 제작 방법 중 두꺼운 감광막을 이용한 마이크로 구조물의 제작 방법에 대해 연구하였다. 두꺼운 감광막을 이용하여 구조물을 제작할 시에는 혈액 채취에 필요한 바늘 부분과 채널, 그리고 반응챔버 부분을 동시에 같은 공정으로 제작이 가능하여 효율적인 제조가 가능하다. 본 연구에서 미세전극을 먼저 실리콘 기판 위에 제작하고, 그 위에 절연막을 증착한 다음 마이크로 구조물을 제작함으로써 마이크로 구조물과 미세전극을 집적화 할 수 있게 되었다.(그림 3-8-13)

그림 3-7-14 는 전극과 구조물을 집적화하여 혈액분석용 바이오센서를 제작하는 공정도이다. 기판은 실리콘 기판을 이용하여 제작하며 제작방법을 간략히 설명하면 다음과 같다.

(1) 실리콘 기판위에 열산막을 성장시키고, 그 위에 공정 뒷부분에 기판의 식각시에 masking layer로 필요한 LPCVD 실리콘 질화막을 증착한다. 그리고 뒷면의 기판 식각의 패턴을 형성한다.

(2) working electrode로 이용될 gold를 thermal evaporation하고 전극 모양으로 패턴을 형성하는데 이때에 뒷면에 있는 패턴과의 정렬이 중요하다.

(3) 기준 전극으로 이용될 silver를 liftoff 공정으로 증착한다.

(4) 전극과 전극사이의 전기적 절연과 전극과 마이크로 구조물 사이의 절연을 위하여 PECVD 실리콘 질화막(SiNx)을 증착하고 전극 부분을 노출시키기 위해 실리콘 질화막 패턴을 형성한다.

(5) 마이크로 구조물 형성시에 전기도금의 seed layer용 gold을 증착한다.

(6) 마이크로 구조물을 제작하는 공정으로 채널과 바늘, 반응챔버의 바닥면으로 이용될 Ni구조물을 형성한다.

(7) 마이크로 구조물의 벽면과 채널과 바늘의 윗면을 위한 MESD와 전기도금 공정이 다.

(8) 바늘 형성을 위한 공정으로 기판을 식각한다.

[연구 결과 및 고찰]

가. 마이크로 채널 형성 결과

(1) 그림 3-7-15는 시간에 따른 웨이퍼의 수평 방향으로 진행되는 다공질 실리콘의 단면 사진이다. 그림 3-7-16은 제작한 모노리딕 미소 채널의 단면 사진이다.

이중 확산법을 이용하여 실리콘의 다공질화 방향을 웨이퍼의 수평 방향이 되게 하였다. 수평 방향의 다공질 실리콘을 식각하여 미소 채널을 제작하였다.

(2) 그림 3-7-17은 MESD법과 전기도금을 이용한 마이크로 채널을 제작 결과를 나타낸다. (a)는 마이크로 채널의 밑부분용 두꺼운 감광막 몰드이고, (b)는 그 몰드를 이용하여 니켈을 도금한 현미경 사진이다. (c)는 채널의 옆면과 위면을 형성하기 위한 두꺼운 감광막 사진이고 (d)는 채널이 형성될 때 동시에 반응챔버의 벽면도 형성되는데 그 부분의 감광막 몰드 사진이다. (e)는 (c),(d)의 몰드를 이용하여 니켈도금을 하는 공정 중의 현미경 확대 사진이고 이때 채널부분의 벽면이 먼저 형성되는 것을 나타내고있으며, (f)는 니켈도금 공정이 모두 끝난 후 채널부분의 위부분이 덮여있는 현미경 사진이다. (g)와 (h)는 이렇게 제작된 마이크로 구조물의 SEM사진이다.

그림 3-7-18은 그림 3-7-17에서 설명한 공정을 이용하여 제작된 마이크로 채널의 끝부분을 나타내는 사진이며, 그림 3-7-19는 제작된 마이크로 구조물의 전체 현미경 사진인데, 제작된 마이크로 채널의 모세관 현상을 분석하기 위해 실험을 한 결과이다. 제작된 마이크로 채널의 끝부분을 수직으로 잉크에 담그고 챔버쪽에 잉크가 모세관현상에 의해 이동하는 실험결과를 나타낸다. 채널의 총 길이는 4mm이고, 잉크가 이동하는데 걸린 시간은 5초이내 였다.

나. 미세전극 제작 결과

(1) 그림 3-7-20은 기준 전극으로 이용될 Ag/AgCl 전극의 SEM 사진이다. silver을

liftoff 공정으로 형성한 후 그 위에 AgCl을 형성한 것이다.

그림 3-7-21은 silver을 형성하기 위해 liftoff 공정에 필요한 감광막의 패턴의 단면 사진인데, 감광막의 수직면과 두께에 따라 liftoff 공정으로 형성한 silver 전극의 단면의 매끄러운 정도가 결정된다. 형성된 silver 전극의 옆면의 상태가 중요한 이유는 전극위에 전기적 절연을 위하여 증착하는 절연막이 PECD 실리콘 질화막(SiNx)인데 이 절연막이 전극의 옆면의 상태가 거칠어 질 때 step coverage가 좋지 않아서 옆면부분에 전기적 절연 성공적으로 이루어지지 않을 수 있다. 그림 3-7-22는 본 연구에서 silver 전극의 형성한 다음 절연막의 step coverage특성을 본 것으로, (a)(c)(e)는 기판위에 silver 전극을 형성한 사진이고, (b)(d)(f)는 각각의 silver 전극위에 실리콘 질화막을 증착한 다음 옆면의 step coverage를 보기 위한 단면사진이다. 사진에서 보듯이 절연막의 step coverage특성이 아주 우수함을 알 수 있다.

(2) 그림 3-7-23은 4개의 gold 전극과 4개의 silver 전극으로 이루어진 multi 전극을 제작한 현미경 사진인데, gold 전극에는 각각 다른 미세전극의 배열이 형성되어있고 이를 확대한 것이 그림3-7-24이다. 제작된 미세전극의 배열은 직경이 5um인 원형 모양의 미세전극 20X20 배열이 제일 작은 크기이고 직경이 100um까지 성공적으로 제작하였다.

(3) 그림 3-7-25는 제작된 전극에 효소를 고정화하여 버퍼용액에서 전극의 특성을 분석한 것으로 2.5mM의 포도당에 반응하는 전극의 응답특성이다. 이때 사용된 전극의 면적은 0.15cm²이며 그림 3-7-26에서 이 전극의 calibration 곡선을 보여주고 있다. 그림 3-7-27과 28은 제작된 미세전극의 특성을 관찰한 것으로 결과에서 알 수 있듯이 매크로한 전극의 특성이 아닌 미세전극의 특성을 잘 나타내고 있다.

제 8 절 Gene expression monitoring을 위한 실험방법의 확립 및 DNA chip 제작

[연구개발 방법]

1. Gene expression monitoring을 위한 실험방법 확립

DNA chip을 이용한 gene expression monitoring의 실험방법은 실험균주의 mRNA 분리, 역전사 (reverse transcription), cDNA을 형광물질로 labeling, labeling된 cDNA와 chip위의 DNA와의 hybridization으로 요약될 수 있다. Gene expression monitoring을 수행하기 위해 지금까지 문헌에 보고된 연구방법은 대략 다음과 같다⁹⁶⁾⁹⁷⁾⁹⁸⁾. 여러 성장조건 (ex. 여러종류의 탄소원, 온도, pH 등)에 따라 성장시킨 균체에서 mRNA를 추출한 후, 역전사에 의해 cDNA를 만든다. *In vitro* transcription과정에서 형광으로 labeling된 mRNA를 DNA array와 hybridization시킨다. 성장조건에 따라 chip에 포함된 gene들의 발현정도(expression level)가 달라지고, 이는 검색과정에서 신호의 세기의 변화로 나타나게 된다. 따라서 여러 실험조건에 따라 hybridization pattern이 달라지며, 이들을 서로 비교함으로써 세포의 특정 작용에 관련된 유전자들과 성장조건에 따른 발현 정도 등을 확인할 수 있게 된다.

가. RNA 분리

배양액 10 mL을 6000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 cell pellet을 모은 후, 0.5 mL의 ice-cold buffer를 넣은 후 섞어준다. 이 용액 0.3 mL과 30 μ L의 ribonuclease (Vanadyl Ribonuclease Complex, BRL), hot lysis buffer 0.3 mL, Proteinase K (20 mg/mL) 3 μ L를 차례로 넣고 섞어준 후, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 30분간 놓아두어 cell lysis 시킨다. Phenol extraction을 통해 DNA와 RNA를 추출한 후, 에탄올 침전시킨다. 4 $^{\circ}$ C, 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상온에서 말린 후, DEPC로 처리된 물 200 μ L에 녹인다. RNase-free DNase를 12 units 넣어 준 후 37 $^{\circ}$ C incubator에서 35분간 반응시켜 DNA를 제거한다. Phenol extraction과 에탄올 침전, 원심분리를 거친 후 DEPC로 처리된 물 200 μ L에 녹인다. 분리한 RNA는 formaldehyde-agarose gel electrophoresis를 사용하여 확인하였다.

※ Ice-cold buffer : 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris (pH 7.4)

Hot lysis buffer (preheated to 65 $^{\circ}$ C): 0.4M NaCl, 40 mM EDTA, 1 % SDS,
1 % β -mercaptoethanol, 20 mM Tris (pH 7.4)

나. Probe 제작 (Labeling method)

(1) 역전사를 통한 cDNA 합성중의 형광물질로의 labeling

분리한 RNA를 주형(template)으로 하여 역전사하여 형광물질(fluorescence)로 labeling된 cDNA를 합성하였다. 5 μ g의 total RNA에 random hexamer를 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 둔 후, 얼음에 5분동안 놓아둔다. 여기에 PCR buffer, MgCl₂, dNTP, Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP (Amersham), 0.1M DTT를 넣은 후, 25 $^{\circ}$ C에 5분간 둔다. 사용된 dNTP농도는 dATP, dCTP, dGTP가 각각 500 μ M, dTTP는 200 μ M이며, Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP는 100 μ M이다. 이 용액에 200 U의 reverse transcriptase (SuperScript II RT, GibcoBRL)을 넣고 다음과 같이 역전사를 수행한다. 25 $^{\circ}$ C에서 10분간, 42 $^{\circ}$ C에서 2시간, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간동안 둔 후 4 $^{\circ}$ C로 온도를 내려 반응을 종결한다. RNase H를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 놓아둔 후, TE buffer (pH 8.0) 470 μ L를 넣어 희석한다. 이 희석용액을 Centricon-30 microconcentrators (Amicon)을 이용하여 5 μ L정도로 농축한다. Label된 cDNA 용액은 10 %의 SDS 0.2 μ L가 첨가된 4 \times SSC buffer 11 μ L에 보관한다.

(2) 추출한 total RNA을 형광물질로 labeling

분리한 RNA 용액을 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓인 후, 얼음에 놓아둔다. 여기에 7 nmol의 psoralen-biotin을 넣은 후 365 nm 파장의 UV를 3시간 동안 가해 RNA와 psoralen을 cross linking시킨다. n-butanol을 가해 crosslinking되지 않은 RNA를 제거한 후, 에탄올 침전 후 DEPC로 처리된 물 12 μ L을 가한다. label 된 RNA 용액은 -20 $^{\circ}$ C에서 보관한다.

다. Hybridization & Detection

위에서 만든 Labeled probe 12 μL 에 0.2 μL 의 10 % SDS를 넣은 후 2 분간 끓인다. 얼음에서 급속 냉각 후, 준비된 DNA chip (아래 참조) 표면에 용액을 놓고 cover glass로 덮는다. Hybridization chamber에 chip을 넣고 65 $^{\circ}\text{C}$ water bath에서 12 시간 정도 놓아둔다.

Labeled RNA를 probe로 이용하였을 경우는 hybridization 후 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 streptavidin-phycoerythrin conjugate (Molecular Probes)로 staining 후, 6 \times SSPE-T buffer (0.9 M NaCl, 60 mM NaH_2PO_4 , 6 mM EDTA, 0.005 % Triton X-100)로 세척 후 scan하였다. Streptavidin은 biotylated protein (biotin)과 결합하며, phycoerythrin은 형광물질로서 검색과정에서 감지된다. Labeled cDNA를 probe로 이용하였을 경우는 hybridization 후 0.2 \times SSC buffer로 chip을 씻은 후 scan하였다.

2. DNA chip 제작

가. Microarrayer 제작

고밀도의 DNA chip을 제작하기 위해서는 자동화된 microarrayer의 개발이 선행되어야 한다. 본 연구진은 2축과 1축의 robot slide의 조합으로 이루어진 system과 구동 소프트웨어를 자체제작하였다. DNA의 고정방식은 spotting 방법을 채용하였으며, 국산(삼성전자) 로봇축을 조합, 이용하여 spotting microarrayer를 제작하였다 (그림 3-8-1). Microarrayer의 구동을 위해 Microsoft사의 Visual C++ 5.0을 이용하여 GUI 기반의 구동 software를 개발하였다 (그림 3-8-2). x, y, z 로봇축의 stroke는 각각 600, 600, 200 mm이며, 이중 y,z 축은 spotting을 위해 직교로 연결하고, x 축은 DNA chip의 solid support를 운반하는 slide platter를 움직인다. 각 축의 제어는 operating program에서 내려진 명령이 controller (MMC controller, 삼성)에 의해 각 축의 servo drive로 전달되고, 각 motor와 encoder와 연결된 servo drive는 전달된 신호에 따라 각 축의 위치제어를 수행하는 방식으로 이루어진다.

DNA chip 고정화를 위한 printing tip은 그 끝이 25 μm 정도로 wire cutting되어 있으면 직경은 1/16 inch이다 (Die-Tech, San Jose, CA). Printing tip의 세척을 위한 clean station과 기타 부속 장치는 교내 공작실에서 제작하였다.

나. 대장균 chip (*E. coli* chip)의 제작

(1) 유전자 합성

Gene expression monitoring을 위한 대상 유기체로 *E. coli* K-12의 derivative인 *E. coli* W3110을 선정하였다. *E. coli*의 full genome sequence는 미국 Wisconsin대학 *E. coli* genome project home page (<http://www.genetics.wisc.edu/>)에서 받았으며, 이를 바탕으로 PCR을 수행하여 *E. coli* 유전자를 합성하였다. PCR을 위한 주형으로는 *E. coli* W3110에서 chromosome을 추출하여 사용하였으며, primer의 염기서열은 primer 제작 프로그램을 자체 제작하여 결정하였다. 현재 heat shock에 관련된 유전자 5종 (*groES*, *dnaJ*, etc)과 secretion 관련 유전자 11종 (*secA*, *secD*, etc), TCA cycle 관련 유전자 27종 (*aceF*, *icdA*, etc), 그리고 Glycolysis 관련 유전자 28종 (*talE*, *manA*, etc)을 PCR을

이용하여 합성하였다.

(2) DNA chip의 solid support 제작

DNA chip 제작을 위한 solid support로는 slide glass를 poly-L-lysine (Sigma)으로 coating한 modified slide glass를 사용하였다. NaOH용액과 에탄올이 섞인 용액에서 slide glass를 세척한 후, poly-L-lysine용액에 담궈서 coating 한다. 유리표면의 용액을 원심분리로 제거한 후, 이를 간단히 말린 후, slide glass rack에 옮겨 보관하였다.

(3) *E. coli* chip의 제작

자체제작한 microarrayer를 이용하여 modified slide glass 위에 각 유전자를 spotting한 후, UV cross linking으로 고정화시킨다. Succinic anhydride (Aldrich)를 n-methyl-pyrrolidinone (Aldrich)에 녹인 용액을 이용하여 DNA가 박혀 있지 않은 부분의 lysine 작용기를 blocking시킨다. 95 °C에서 2분간 slide glass를 넣은 후, 상온의 95% 에탄올에 옮겨 1분간 둔다. 유리표면의 용액을 원심분리로 제거한 후, 이를 상온에서 보관하였다.

[연구 결과 및 고찰]

1. Microarrayer의 개발

국내에서의 DNA chip 관련연구에서 가장 문제가 되는 것은 정작 연구에 사용될 DNA chip 제작기술이 전무하다는 것이다. 더욱이 DNA chip제작은 chip이 쓰일 연구대상이 무엇이나에 따라 달라지기 때문에 응용 연구대상의 실험방법과정과 검색과정도 함께 고려되어야 하므로 쉽게 DNA chip제작에 착수할 수 없다는 어려움이 있다. 본 연구에서는 대장균의 유전자를 chip에 포함시킨 *E. coli* chip을 개발하려 하였다. 대장균은 재조합 유전자 기술에 가장 많이 이용되고 있어 본 연구결과의 효용성과 여러 생물 연구분야의 적용이 클 것으로 기대된다. 또한 연구가 많이 이루어진 유기체이기도 하여서, 본 연구의 최종목표인 각 유전자간의 상호작용과 연관성을 밝히는 데 적합하다고 판단되어진다.

고밀도의 DNA chip을 제작하기 위해서는 자동화된 microarrayer의 개발이 선행되어야 한다. 본 연구진은 2축과 1축의 robot slide의 조합으로 이루어진 system을 제작하였으며, 현재는 이의 구동을 위한 소프트웨어를 제작하였다.

Chip에 포함되는 spot 직경은 75 ~ 150 μm 이며, spot간 간격 (center to center)은 spot 직경을 고려할 때, 200 μm 정도로 유지할 수 있다. 성능 테스트로 18mm \times 18 mm 면적(cover glass size)에 4900 개의 ink spot을 찍었을 때, 동일 간격으로 매우 정밀하게 찍혔음을 확인할 수 있었다 (그림 3-8-3).

2. Gene expression monitoring을 위한 실험방법 확립

Probe를 제작하기 위해 두가지의 labeling 방법을 적용하였다. 하나는, 분리된 RNA에 직접 형광물질(Streptavidin-R-phycoerythrin conjugate)을 labeling시킴으로써 만들어졌

으며, 다른 하나는 분리한 RNA를 template로 하여 역전사하는 동안 Cy5 dye로 labeling 된 cDNA를 이용하였다. 전자의 경우는 실험과정을 줄일 수 있어 실험상의 오차를 줄일 수 있다는 장점에서 시도되었으나, 최종 detection과정에서 만족할만한 결과를 얻지 못했다. Probe로서 불안정한 RNA를 직접 쓰기 때문에 알지 못했던 다른 요인이 작용했으리라 추정하고 있으며, 실험이 더 진행되어야 할 것으로 보인다. 후자의 방법을 이용하였을 때는 detection과정에서 gene expression level의 차이점을 확인할 수 있었다.

3. PCR에 의한 유전자 합성을 위한 primer 제작 프로그램의 제작

본 연구에서 연구대상으로 정한 *E. coli* 는 4300여 개의 유전자로 구성되어 있다. Chip에 포함될 유전자를 PCR에 의해 합성할 경우, 하나의 유전자에 대해 한쌍씩의 primer (forward & backward)가 필요하게 되어 8600 여개의 primer sequence를 결정해야 한다. 이를 melting temperature (T_m)을 고려하여 연구자가 직접 계산하여 결정한다면, 많은 시간과 노력이 소요되며, 부정확하다고 판단되어 primer 제작 프로그램을 제작하였다.

본 연구진은 *E. coli* 유전자의 library를 만들기 위해 PCR에 의해 합성된 유전자를 pUC19 plasmid에 넣어 cloning하고 있다. 따라서 primer 염기서열 결정시 고려되어야 할 사항은 T_m , 유전자내에 restriction enzyme site, 길이 등이다. 현재 web상에서 Primer 라는 프로그램을 사용할 수 있으나, cloning을 위한 enzyme site을 primer sequence에 추가하는 기능과 유전자 내의 enzyme site를 탐색할 수 있는 기능이 없어 몇 개의 프로그램을 더 사용하여야 한다. 하나의 유전자에 대한 primer를 결정하기 위해 몇 개의 프로그램을 사용하고 그 결과를 정리하는 것 또한 너무 많은 시간과 노력이 들 것으로 판단된다. 본 연구진이 개발한 프로그램은 유전자의 염기서열만 넣어주면, vector 내의 multicloning site에 존재하는 restriction enzyme들의 유전자 내 위치와, 이를 고려하여 enzyme site를 포함한 primer sequence를 결정해주며, 그 결과를 정리하여 text파일로 만들어준다. 현재 이 프로그램을 사용하여 140 여개의 primer sequence를 결정하여 primer를 제작하였다.

4. 대장균의 heat shock reponse

Gene expression monitoring을 위한 실험방법의 위해 대장균의 heat shock 조건에서의 유전자의 발현정도를 알아보았다. 실험균주는 *E. coli* W3110이며, 비교균주는 37 °C LB 배지에서 배양시켰고, 실험균주는 37 °C, LB배지에서 성장시킨 후 57 °C에서 7분간 heat shock을 가하였다. 비교균주에서 합성한 cDNA는 역전사중 Cy3로, heat shock 균주의 cDNA는 Cy5로 labeling 하였다.

본 실험에 쓰인 DNA chip 제작을 위해 modified slide glass 위에 유전자를 고정시켰다. 검색 유전자는 heat shock 관련 유전자로서 groES, dnaJ를 비교 유전자(positive control gene)로서는 sfcA (Maleic enzyme), ompC, PEP-carboxylase kinase 를 선택하였다. 검색은 ScanArray3000 (General Scanning Co, CA)를 이용하였으며, 비교균주에 대한 유전자의 발현은 녹색으로 heat shock균주는 Cy5로 image processing 후 두 image를 overlapping하였다 (그림 3-8-4).

검색결과 heat shock 균주는 heat shock 유전자 (groES, dnaJ)에서 매우 높은 발현을 보였으며, heat shock을 주지 않은 균주는 검색 유전자 모두에 대해 고른 발현을 보였다.

정량적인 결과를 얻을 수는 없었으나, image processing과 data 정량분석을 위한 프로그램을 사용할 경우, 더 좋은 실험 결과를 얻을 수 있으리라 여겨진다.

여 백

제 4 장

연구개발목표 달성도 및 대외기여도

여 백

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발목표 달성도 개발

1. DNA chip 시스템의 개발 (의과학연구소 유옥준)

- 가. 혈중 압 지표 단백질 측정용 면역 전극 개발: 75%
- 나. 분석용 유전자의 검색 및 oligonucleotide 설계: 75%
- 다. 유리 표면에 DNA를 화학적으로 고정하는 방법 개발: 60%
- 라. DNA chip scanner 제작: 100%
- 마. Scanner 구동용 software 작성: 100%
- 바. 형광신호검출 및 영상 프로세싱 프로그램 작성: 100%
- 사) DNA microarray의 설계 및 제작: 100%

2. LDH, AST, Glucose 측정용 전기화학식 후막형 멀티 바이오센서의 개발(생물과학과 김학성)

- 가. 후막소자기법(thick-film technology)을 이용한 전극제작 시스템의 구축
 - (1) 바이오센서의 제작을 위한 screen template의 고안 및 제작 : 100 %
 - (2) Working ink composition의 결정 : 100 %
 - (3) 제작된 바이오센서의 재현성 확보 : 100 %
- 나. 바이오센서 내에서의 NADH의 전기화학적 특성 탐색 : 100 %
- 다. Electron transfer mediator의 채용을 통한 바이오센서의 응답신호 증폭가능성의 탐색
 - (1) Electron transfer mediator의 결정 및 전기화학적 특성 연구 : 100 %
 - (2) Electron transfer mediator에 의한 응답신호 증폭가능성 탐색 : 100 %
- 라. LDH, AST, glucose 측정용 바이오센서의 개발
 - (1) LDH 바이오센서의 개발 : 100 %
 - (2) AST 바이오센서의 개발 : 30 %
 - (3) Glucose 바이오센서의 개발 : 30 %

3. 자기조립 생체분자의 전기화학적 특성 연구(화학과 곽주현)

- 가. 전극 위에 자기조립한 thiol 분자들의 박막층에 cytochrome c 를 배열시키고 Cyclic voltammetry를 통해 전기화학적 특성 조사: 100%
- 나. 극미세전극배열 Chip의 연구: 100%
- 라. EDC를 사용하여 thiol의 단분자막과 cytochrome c를 공유결합 시킴으로써 금 전극 자체와는 직접적으로 전자전달 반응을 잘 일으키지 않는 cytochrome c 의 전자전달 반응 확인: 100%
- 라. STM으로 생체분자가 흡착된 전극 표면 연구: 100%

2. 당초 연구 목표에는 없었으나 추가로 달성하였음.

4. 생화학적 소자 재료의 합성 (화학과 이영훈)

- 가. Ferredoxin 유전자의 cloning: 100%
- 나. His-tag 단백질의 합성: 100%
- 다. 생체고분자 layer의 모델링과 promotor 합성: 100%
- 라. 여러 promotor를 이용한 전자 전달 단백질의 소자 재료로의 특성조사: 100%
- 마. Ni²⁺-SAM의 합성: 100%
- 바. 다양한 전자 전달 단백질의 합성 및 특성조사: 100%

5. 다기능 극소형 BioChip 개발을 위한 on-chip bio-object delivery 및 micro-transport system의 구성과 관련 기술 확보 (기계공학과 조영호)

- 가. 혈액 물성(표면장력, 밀도) 및 wetting의 실험적 측정 및 분석: 100%
- 나. 미소 채널 및 디퓨저(μ -diffuser)의 설계, 제작 및 분석: 100%
- 다. 미소 구동원리 및 미소 박막재료의 물성 측정 및 실험: 100%
- 라. 미소 펌프의 제작과 미소유동의 실험적 분석: 100%
- 마. 미소 디퓨저 밸브 제작과 미소유체 이송 방향성 시험 및 분석: 100%

6. 다중 센서 신호 처리에 관한 연구 (전기 및 전자공학과 이수영)

- 가. 기존에 많이 쓰이는 통계학적인 방법에 의한 다중센서 신호처리 방법의 단점을 보완하는 신경회로망을 이용하는 기술을 확립: 100%
- 나. 신경회로망을 회로 수준까지 이해하고 직접 layout하는 기술을 확립하였으며 이미 제작된 신경회로망 칩을 이용해 간단한 패턴인식 문제를 실험: 100%
- 다. 기존의 신경회로망 칩의 단점을 보완하여 학습능력을 높인 신경회로망 칩을 설계하고 시뮬레이션: 100%
- 라. 기존의 신경회로망 칩을 보완할 새로운 칩을 제작하여 실험적 검증: 30%

7. Multi-biosensor를 위한 미세 구조 연구 (전기 및 전자공학과 한철희)

- 가. 효율적인 마이크로 채널을 형성하기 위한 식각 공정을 확립하였고 보다 효율적인 방법으로 챔버와 채널을 동시에 제작하여 집적하는 삼차원 구조 형성 공정을 확립: 100%
- 나. thermal evaporator를 사용하여 gold 와 silver 전극을 형성하고 각각 사진현상 공정과 liftoff 공정을 사용하여 전극의 패턴을 만드는 공정을 확립: 100%
- 다. 전기 증합 방식을 이용하여 미세 전극 구조에 효소를 고정화하고 패턴을 형성하는 공정을 확립: 100%
- 라. multi 전극을 형성하기 위해 반도체 공정을 응용하여 silver와 gold을 이용한 다중 전극 공정을 확립: 100%
- 마. 혈액분석용 bio-chip에 필요한 미소 구조물을 새로운 삼차원 금속 구조물 제작 방법을 이용하여 집적하여 모노리딕하게 제작하는 공정을 확립: 100%
- 바. 기존의 반도체 공정인 금속 증착 방법과 사진현상공정, liftoff 공정을 통하여 미세

전극을 형성하고 새로이 제안된 삼차원 구조물 형성방법을 이용하여, 채널과 반응 챔버를 단일 공정을 통하여 형성함으로써 bio-chip에 필요한 미소채널과 반응 챔버, 미세전극을 효율적이고 안정적으로 제작할 수 있는 방법을 확립: 100%

8. Gene expression monitoring을 위한 실험방법의 확립 및 DNA chip 제작 (화학공학과 이상엽)

가. Gene expression monitoring을 위한 실험방법 확립 (100 %)

나. DNA chip 제작 (100 %)

제 2 절 대외기여도

1. DNA microarray chip 연구

- DNA chip technology는 기존의 생물과학뿐 아니라 기계공학, 광학, 전자공학, 영상처리 등 여러 분야의 종합적인 참여가 필수적인 첨단 분야임.
- 본 연구과제를 통하여 KAIST의 의과학 연구센터의 주도로 각 분야가 협력하여 실제적인 연구 성과를 도출할 수 있었음.
- 연구자들을 중심으로 한 DNA chip의 수요가 점차 증가하는 추세이나 개발 초기 단계인 관계로 선택의 폭이 넓지 않고 관련 장비의 가격도 대단히 비싼 실정임. 본 연구를 통해 DNA chip 제작 및 판독에 필요한 필수 요소 기술을 확보하였으며 이를 활용한 연구 성과 확대 및 사업화에 기여할 수 있는 기반을 마련하였음.

2. 진단용 바이오센서 개발 연구

- 후막기술을 이용한 바이오센서의 제작시스템 구축으로 바이오센서의 상업화 기술의 기반 확립.
- 연구결과 개발된 바이오센서는 NAD(H)-dependent dehydrogenase를 채용한 model case로서 NAD(H)를 조효소로 가지는 여타 효소군에 넓은 응용이 가능하게 됨.
- 혈액 분석 분야이외의 다른 biomedical, bioelectronics에 응용 가능한 마이크로머시닝 기반 기술의 확립.

3. 전기화학적 특성을 지닌 생체분자의 특성 및 응용 연구

- 금전극상에 thiol의 단분자층을 입히고 특정한 작용기를 가지는 다양한 유기분자를 도입하게 되면 그 작용기의 성질에 따라서 biosensing devices, immunosensor, microcontact printing, nanoparticle의 제조 등의 다양한 분야로의 학문적 접근이 가능하다. 그러므로 단분자층을 입히고 그 작용기의 성질을 바꾸어나가는 기술의 습득은 이런 접근에의 기여도가 매우 큼.
- 본 연구를 통하여 고체 표면 위에서 다양한 promotor들의 monolayer를 형성시키는 기술을 향상시킬 수 있었으며 이와 같은 기술을 바탕으로 다양한 생화학적 인소자재료 개발에 기여할 것임.
- 다양한 전자 전달 단백질의 발현 및 정제 system을 통하여 전자 소자로 쓰일 수

있는 다른 종류의 단백질을 효율적으로 제조할 수 있는 기술을 축적함.

4. MEMS 기술을 이용한 바이오칩 제작 요소기술 연구

- 표면장력 및 모세관을 이용한 혈액의 물성(표면장력, 밀도) 측정과 wetting에 관한 기초 연구를 통해 미소영역에서의 미소유체의 특성과 관련 현상에 관한 이해를 증대시켰으며, 극미량 bio-object 이송을 위한 미소 채널, 디퓨저, 펌프 등 기본요소를 설계, 제작, 시험하였음.
- 미소 유동발생을 위한 미소 구동원리와 미소 박막재료의 기계적 성질의 연구, 그리고 미소 펌프 및 디퓨저의 특성분석을 통해 극미량 bio-object 이송을 위한 기본요소 기술과 관련 실험자료를 확보함.

제 5 장

연구개발결과의 활용 계획

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. DNA chip 개발 분야

- DNA microarray chip 제작에 필요한 필수 장비 2종을 개발 완료하였음
- DNA를 유리판에 화학적으로 고정하는 방법에 대한 심화 연구가 필요
- Public domain의 유전자 정보 데이터베이스를 전산학적 방법으로 처리하여 chip 형태로 제작하여 유용하게 사용 가능한 유전자 set를 선정하고 chip 데이터의 표준화, 데이터베이스화 및 분석을 할 수 있는 전문인력의 양성이 절대적으로 필요함
- 기업화 추진 방안
DNA chip은 차세대의 유전자 분석 필수 도구로서 많은 국외 기업들이 상업화를 추진하는 중임. 국내에서는 본 연구진을 비롯하여 민간 기업에서 요소 기술을 도출해 내는 단계로서, 본 프로젝트의 연구 성과를 바탕으로 한 사업화가 가능함. DNA chip technology 전체 기술상에서 구체적으로 사업화 가능한 분야의 예를 들면 다음과 같음.
 - DNA microarrayer robot
 - DNA microarray scanner
 - 각종 소모성 물품 (특수 처리된 슬라이드 글라스, printing pin, spotting solution, hybridization solution 등)
 - Clone 또는 완제품 칩/고객 주문 칩의 제작
 - 진단 지표로 활용 가능한 유전자의 확보 및 이를 응용한 칩의 제작
 - Array 관련 소프트웨어: clone database, 칩 영상 분석 소프트웨어, PCR용 프라이머 설계 소프트웨어

2. 혈중 진단 지표 물질을 측정하는 전기화학식 바이오센서의 개발

- 연구결과 확립된 후막소자기법을 이용한 바이오센서의 제작시스템을 이용하여 임상 의학적인 가치를 지니는 다른 분석물질을 측정할 수 있는 바이오센서를 개발할 예정.
- 현재 진행되고 있는 AST 바이오센서 및 glucose 바이오센서의 개발을 완료한 후 현재 개발 완료된 LDH 바이오센서와 통합하여 세 가지 분석물질을 동시에 측정할 수 있는 멀티 바이오센서를 개발할 예정.
- 연구수행과정에서 축적된 기반기술을 바탕으로 하여 새로운 개념의 바이오센서에 대한 개발 가능성 탐색.
- 의료 진단 및 재활 관련된 미세 가공기술의 응용이 본격화 되고 실행할에도 많이 적용되어 사고 및 긴급시 치료가 용이하고 신속히 대처할 수 있음.
- 이루어지게 된다. 반도체 제조공정을 응용하여 제조 비용의 극소화를 통해 개발한 일회용 검사 카트리지의 사용으로 손쉽고, 값싸게 질병 검사가 가능.
- 기존에 판매되고 있는 글로코메타 시장에 진입할 수 있는 사업아이템으로 매우 유용함.

3. 자기조립 생체분자의 전기화학적 특성 연구

- 미세전극 제작 후에 자기조립박막 등으로 표면처리를 함으로써 생화학적 활성을 가지는 전극을 만들 수 있음을 확인함.
- 다양한 생체분자를 이용한 직렬 및 병렬 전자 전달 경로의 자기조립 단분자층을 개발하고 극미세전극 상에 이러한 생체분자로 이루어진 회로를 구성하여 biochip으로 응용가능성을 연구하는데 활용 가능.
- 극미세전극 표면에 자기조립박막을 형성시키는 연구의 추가 진행이 필요함.

4. 생화학적 소자재료의 합성 연구

- 전기 화학적인 측면에서 단백질의 특성을 알아보기 위해서 좀더 안정된 system이 필요한데 온도의 유지나 외부 공기와의 차단 등이 가능한 cell의 제작이나 금 전극을 좀더 이상적으로 만드는 기술 등이 우선적으로 요구됨.
- 전자 전달 단백질 complex의 전자 전달 현상 연구를 위해서 단백질의 interaction에 대한 연구와 구조적인 측면이나 기술적으로 complex를 만드는 방법 등에 대한 연구도 추가적으로 수행되어야 할 것임.
- 전자 전달 단백질 complex의 연구는 생체 내에서 모델 전자 전달 단백질의 메카니즘의 규명에도 많은 도움을 줄 수 있으며, 대부분의 metabolism에서 전자의 전달이 중추적인 역할을 하고 있으므로 이러한 연구는 모델 단백질 하나의 역할뿐만 아니라 전체적인 metabolism의 연구에도 기여할 것임.
- 단백질의 전자 전달 현상의 관찰을 위해서 개발된 많은 promotor들은 단백질 외에도 다른 유기물질이나 무기물질 등의 전기 화학적인 특징을 전극 위에서 관찰하는데 기술적 방법을 제시할 수 있음.

5. MEMS를 이용한 바이오칩 요소 기술 연구

- 본 연구에서 개발한 극미량 bio-object의 이송을 위한 기본요소를 기반으로 하여 향후 기본요소 간의 결합과 관련 미소 복합현상 연구로 발전 가능.
- 극미량 시약 공급을 위한 micro-doser 혹은 micro-dispenser의 개발, 극미량 bio-object의 종합적 분석을 위한 micro-TAS (Total Analysis System)의 개발 그리고 미소 DNA 증식기 및 미소 유전자 분석기 개발을 시도할 계획임.

6. 다중 센서 신호 처리 기술의 연구

아날로그 신경회로망 칩의 단점을 보완한다면 각종 음성인식이나 영상신호처리 분야에 요긴하게 쓰일 것으로 기대됨.

제 6 장

참고문헌

여 백

제 6 장 참고문헌

1. Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. & Trent, J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics (supp.)* 21, 10-14 (1999).
2. Human genome project information web page. http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html>
6. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., & Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467-470 (1995).
7. DeRisi, J.L., Iyer, V. R., & Brown, P.O. *Science*, 278, 680 (1997).
8. Iyer, V.R. et al. The transcriptional program in the response of human fibroblast to serum. *Science*, 283, 83-87 (1999).
9. <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>
10. Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.D., Cronin, M.T., Holmes, C.P., & Fodor, S.P.A. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5011-5026 (1994).
11. <http://www.nanogen.com>
12. <http://www.gatconsortium.org>
13. Davis M., Walker E.A., *Lab. Med.* 1992, 23(9), 591-595
14. David J. Anderson, Baochuan Guo, Yan Xu, Lily M. Ng., *Clinical Chemistry, Anal. Chem.*, 1997, 69, 165R-229R
15. Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R., & Smith, L.M. Direct fluorescence analysis of polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucl. Acids Res.* 22, 5456-5465 (1994).
16. Promega Technical Bulletin, No.213.
17. Southern, E., Mir, K., & Shchepinov, M. Molecular interactions on microarrays. *Nature genetics (supp.)*, 21, 5-9 (1999).
18. Shchepinov, M.S., Case-Green, S.C., Mir, J.U. & Southern, E.M. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res.* 25, 1155-1161 (1997).
19. Goldberg, H. D., Brown, R. B., Liu, D. P. and Meyerhoff, M. E., *Sensors & Actuators*, B21, 171-183 (1994)
20. Hamer, D. W. and Biggers, J.V., edn., *Thick film hybrid microcircuit technology*, Wiley-interscience, 29 (1972)
21. Alvarez-Icaza, M. and Bilitewski, U., *Anal. Chem.*, 65, 525A-533A (1993)
22. Seddon, B. J., Shao, Y. and Girault, H. H., *Electrochimica Acta*, 39 (1994)
23. Park J. K., Yee, H. J. and Kim, S. T., *Biosensors & Bioelectronics*, 10, 587-594 (1995)
24. Bilitewski, U., Chemnitius, G. C., Ruger, P. and Schmid, R. D., *Sensors & Actuators*, B7, 351-355 (1992)
25. Gilmartin, M. A. T. and Hart, J. P., *Analyst*, 119, 833-840 (1994)
26. Hampp, N., Eppelsheim, C., Popp, J., Bisenberger, M. and Brauchle, C., *Sensors & Actuators*, A31, 144-148 (1992)
27. Kulys, J. and D'costa, E. J., *Anal. Chim. Acta*, 243, 173-178 (1991)
28. Gorton, L., Scoregi, E., Dominguez, E., Emneus, J., Jonsson-Pettersson, G. and Marko-Varga, G., *Anal. Chim. Acta*, 250, 203-248 (1991)
29. Nagata, R., Yokoyama, K., Clark, S. A. and Karube, I., *Biosensors & Bioelectronics*, 10, 261-267 (1995)
30. Bard, A. J. and Faulkner, L. R., edn. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, John Wiley & sons, 1 (1980)
31. Bartlett, P. N., Tebbutt, P. and Whitacker, R. G., *Prog. Reaction Kinetics*, 16, 55-155 (1991)
32. Gorton, L., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.1*, 82, 1245-1258 (1986)
33. Moiroux, J. and Elving P. J., *Anal. Chem.*, 50, 1056-1062 (1978)
34. Moiroux, J. and Elving P. J., *Anal. Chem.* 51, 346-350 (1979)
35. Moiroux J. and Elving P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 6533-6538 (1980)

36. Torstensson, A., Gorton, L. J., *J. Electroanal. Chem.*, 130, 199 (1981)
37. Tanaka, K., Tokuda, K., Ohsaka, T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1770 (1993)
38. Kulys, J., Glwixner, G., Schuhmann, W., Schmidt, H. L., *Electroanalysis*, 5, 201 (1993)
39. Gui, J. Y., Hance, G. W., Kuwana, T., *J. Electroanal. Chem.*, 309, 73 (1991)
40. Amine, A., Kauffmann, J. M. and Patriarche, G. J., *Anal. Lett.*, 24 (1991)
41. Tse, D. C. S., Kuwana, T., *Anal. Chem.*, 50, 1315 (1978)
42. Pariente, F., Lorenzo, E. and Abruna, H. D., *Anal. Chem.*, 66 4337 (1994)
43. Tobalina, F., et al., *Anal. Chem.*, 67 3936 (1995)
44. Santo, Y.; Mizutani, F.; *J. Electroanal. Chem.* 1997, 438. 99-104.
45. Patel, N.; Davies, M. C.; Hartshorne, M.; *Langmuir* 1997, 13. 6485-6490.
46. Song, S.; Clark, R. A.; Bowden, E. F.; *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 6564-6572.
47. Sagara, T.; Niwa, K.; Sone, A.; Hinnen, C.; Niki, K.; *Langmuir* 1990, 6. 254-262.
48. Tarlov, M. J.; Bowden, E. F.; *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 1847-1849.
49. J, P, Riehm.; H, A, Scheraga. *Biochem.* 1966, 5, 99.
50. Tarlov, M. J.; Bowden, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 1847.
51. Laviron .E *Biochem.* 1979, 18, 248.
52. Bard, A. J. ; Faulkner, L. F. *Electrochemical Methods ; John Wiley & Sons: New York, 1980.*
53. Ulman, A. *Chem. Rev.* 1996, 96, 1533.
54. Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films; Academic Press: Boston, 1991.*
55. Kolb, D, M.;Dakkouri, A. S. Batina, N. In *Nanoscale Probes of the Solid/Liquid Interface*;Gerwirth, A. A.;Siegenthaler, H., Eds.;NATO ASI Series E288; Kluwer: Dordrecht, 1995.
56. Li, J.; Cheng, G.; Dong, S.; *J. Electroanal. Chem.* 1996, 416. 97-104.
57. Jin, W.; Wollenberger, U.; Kargel, E.; Schunck, W. H.; Scheller, F. W.; *J. Electroanal. Chem.* 1997, 433. 135-139.
58. Fret, B. L.; Jordan, C. E.; Kornguth, S.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* 1995, 67. 4452-4457.
59. Tang C. and Helen L. Henry (1993) *J. Biol. Chem.* 268(7) 5069-76.
60. Katsube Y., Fukuyqma K., Nagahara Y., Tsukihara T., Hase T., and Matsubara H., (1988) *J. Mol. Biol.* 199, 183-193.
61. Abragam Ulman (1996) *Chem. Rev.* 96, 1533-1554.
62. Prime K. L. and Whitesides G. M. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10714-721.
63. *J. Am. Chem. Soc.* (1989) 111(1) Supplementary material.
64. Whitesides G. M., Sigal G. B., Bamdad C. Barberis A., and Strminger J. (1996) *Anal. Chem.* 68, 490-497.
65. Ghelis N., Zervas L., and Photaki I. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1337-1341.
66. Whitford D., Hewson R., and Newbold R. J. (1993) *Protein Eng.* 6(8), 953-964.
67. Guest J. R., Andrews S. G., Smith J. M. A., Hawkins C., Williams J. M., and Harrison P. M. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 329-338.
68. Bowden E. F and Collinson M. (1992) *Langmuir* 8(5), 1247-1250.
69. Guest J. R., Andrews S. G., Smith J. M. A., Hawkins C., Williams J. M., and Harrison P. M. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 329-338.
70. Bowden E. F and Collinson M. (1992) *Langmuir* 8(5), 1247-1250.
71. Patel N., Davies M. C... (1997) *Langmuir* 13, 6485-6490.
72. Hagen W. R., Verhagen M.F.J.M., and Link T. A. (1995) *FEBS Letters* 361, 75-78.
73. Hawkridge R. M. and Crawley C. D. (1983) *J. Electroanal. Chem.* 159 313-324.
74. Bowden E. F. and Glenn J. D. H. (1996) *Chemistry Letters* 399-400.
75. Whitford D., Newbold R. J., and Hewson R. (1992) *FEBS Letters* 314(3), 419-424.
76. Harrison P. M., Andrews S. C. (1995) *J. Biol. Chem.* 270(40), 23268-74.
77. P. Grävesen, J. Branbjerg and O. S. Jensen, "Microfluidics-a review", *J. Micromech. Microeng.*, 3 (1993) pp.168-182.
78. X. N. Jiang, Z. Y. Zhou, Y. Li, Y. Yang, X. Y. Huang and C. Y. Liu, "Experiment and analysis for micro-nozzle/diffuser flow and micro valveless pumps", *Int. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators(Transducers'97)*, Chicago, 1997, pp.369-375.
79. R. D. Blevins, *Formulas for Natural Frequency and Mode Shape*, Van Nostrand Reinhold Company, NY, 1st ed., 1979.
80. R. Zengerle, S. Kluge, M. Richter and A. Richter, *A Bidirectional Silicon Micropump*, Proc. Micro Electro Mechanical Systems Workshop, Amsterdam, Netherlands, 1995, pp.19-24.

81. R. Linnemann, P. Woias, C.-D. Senfft and J. A. Ditterich, A Self-Priming and Bubble-Tolerant Piezoelectric Silicon Micropump for Liquids and Gases, Proc. Micro Electro Mechanical Systems Workshop, Heidelberg, Germany, 1998, pp.532-537.
82. T.G. Kang, K.-S. Seo and Y.-H. Cho, "A Long-Stroke Thermopneumatic Actuator for Applications to Microflow and Pressure Regulation," Proc. Actuators '98, Bremen, Germany (June 1998) pp.62-65.
83. Simon Haykin, "Neural Networks", Prentice Hall, 1994
84. Jeong-Wook Cho and S. Y. Lee, "Analog Neural Network Chip with Learning Capability and its Applications," in Ph. D. Thesis, KAIST, 1997
85. Kyu-Hyeon Kim and K. R. Lee, "A study on VLSI Implementation of Neural Network," in Ph. D. Thesis, KAIST, 1997
86. R.W. Tjerkstra, et al., Etching technology for microchannel, IEEE Proc. of MEMS, 1993, pp. 147
87. J. Mohr, et al., Movable microstructures manufactured by the LIGA process as basic elements for microsystem, Micro System Technologies 90, 1990, pp. 529
88. J. Chen, et al., High-resolution silicon monolithic nozzle array for inkjet printing, in Proc. Transducer95, 1995, pp.321
89. C.S., Lee et al., New fabrication process of single-crystalline silicon islands using double diffusion: application to a heating resistor of a thermal inkjet printhead, JJAP, vol. 37, 1998, pp.7100
90. L. T. Romankiw, and E. J. M. OSullivan, Chapter 5: Plating Techniques, Handbook of Microlithography, Micromachining, and Microfabrication, Vol. 2: Micromachining and Microfabrication, editor: P. R. Choudhury, pp. 241, copublished by SPIE and IEE, 1997.
91. G.T.A. Kovacs, Micromachined Transducers Source Book, McGraw-Hill, Boston(1998), Chap.6
92. L.C.Clark.,C.Lyons. (1962) Ann.NY Acad.Sci.102.29
93. J.H.T.Luong.,A.Mulchandany.,G.G.Guilbault.(1988) Trends in Biotechnology.6,310
94. A.J.Bard.,L.R.Faulkner. (1980) Electrochemical Methods,John Wiley & Sons,New York,23
95. G.G.Guilbault. (1991) Current Opinion in Biotechnology 2,3
96. Antoine de Saizieu, et al., "Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays", Nat. Biotech., 16, Jan.,45-48 (1998).
97. David J. Lockhart et al., "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays", Nat. Biotech., 14, Dec:1675-1680 (1996).
98. Shuang-En Chuang, et al., "Global Regulation of Gene Expression in Escherichia coli", J. Bac., 175(7): 2026-2036, (1993).

여 백

별첨

여 백

[별첨] 공개 발표된 연구 성과 (논문 및 학술회의 발표)

1. Haeyoung Jeong and Ook Ioon Yoo. Development of microarray biochip system; Microarray chip printer and chip scanner. The 10th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular Biology (Oct. 1998).
2. Imsook Kim and Juhyoun Kwak. Electrochemical Responses of Protein Molecules on a Gold Electrode Modified with Mixed Monolayers of Amino and Carboxylic Group. 대한화학회 제 82회 총회 및 학술발표회 (1998년 10월).
3. Imsook Kim and Juhyoun Kwak. Investigation of the Electrode Reaction of Cytochrome c and Pyrroloquinolinequinone at Self-Assembled Monolayers of Amino acid, J. Kor. Electrochem. Soc., Vol. 2(1), 1999, 27-30.
4. Jeung Sang Go and Young-Ho Cho. Experimental evaluation of anodic bonding strength based on the Taguchi analysis of maximum interfacial fracture toughness. Sensors & Actuators, Vol. 73, 1999, pp.52-57.
5. 강태구, 서경선, 조영호, 백오현, 황응린, 문재호. 박막의 기울기 변형을 이용한 열공압 구동방식의 장행정 소형 액추에이터. 대한기계학회 논문집, 제22권, 제5호, 1998, pp.756-766.
6. Jeung Sang Go and Young-Ho Cho. Design and strength evaluation of an anodically bonded pressurized cavity for wafer-level MEMS packaging. Proc. Symposium on Micromechanical Systems, ASME, Anaheim, CA, 1998, pp.357-360.
7. 류지철, 강태구, 조영호. 방사형 자기장 내의 전기도금된 평면코일을 이용한 전자기형 마이크로 액추에이터. 제1회 MEMS 학술대회 논문집, 1999, pp.29-36.
8. 강태구, 조영호. 기관단위 밀봉 패키징을 위한 내압 동공열의 설계 및 강도평가. 제1회 MEMS 학술대회 논문집, 1999, pp.195-202.
9. S.Y. Jeong and S.Y. LEE. Adaptive learning algorithm to incorporate additional functional constraints into neural networks. World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics, and Informatics, pp. 574-580, July 12-16, 1998, Orlando, USA.
10. J.-B. Yoon, J.-D. Lee, C.-H. Han, C.-K. Kim. 3-D Micro-structure Fabrication Technology and Its Application to Inkjet Printhead. Proceedings of The 5th Korean Conference on Semiconductors, KCS '98 (Feb. 1998)
11. Jun-Bo Yoon, Jae-Duk Lee, Chul-Hi Han, Eui-Sik Yoon, and Choong-Ki Kim. Uniform and Simultaneous Fabrication of High-Precision and High-Density Nozzles, Channels, and Cavities for Inkjet Printheads. SPIE's Symposium on Micromachining and Microfabrication, Santa Clara, CA, Sep. 20-22, Proc. SPIE Vol. 3511, pp. 214-224, 1998.
12. Jun-Bo Yoon, Chul-Hi Han, Eui-Sik Yoon, and Choong-Ki Kim. Novel Two-Step Baking Process for High-Aspect-Ratio Photolithography with Conventional Positive Thick

- Photoresist. SPIE's Symposium on Micromachining and Microfabrication, Santa Clara, CA, Sep. 20-22, Proc. SPIE Vol. 3512, pp.316-325, 1998.
13. Jun-Bo Yoon, Jae-Duk Lee, Chul-Hi Han, Eui-Sik Yoon, and Choong-Ki Kim. Multilevel Microstructure Fabrication Using Single-Step 3D photolithography and Single-Step Electroplating. SPIE's Symposium on Micromachining and Microfabrication, Santa Clara, CA, Sep. 20-22, Proc. SPIE Vol. 3512, pp. 358-366, 1998.
 14. Jun-Bo Yoon, Chul-Hi Han, Eui-Sik Yoon, and Choong-Ki Kim. Novel Monolithic and Multilevel Integration of High-Precision 3-D Microfluidic Components. SPIE's Symposium on Micromachining and Microfabrication, Santa Clara, CA, Sep. 20-22, Proc. SPIE Vol. 3515, pp. 183-191, 1998.
 15. Choon-Sup Lee, Chul-Hi Han. A New Wide-Dimensional Floating Microstructure Fabrication Technology Using Laterally Anodized and Oxidized Porous Silicon as a Sacrificial Layer with Double Diffusion. Proceedings of The 6th Korean Conference on Semiconductors, KCS '99, Feb. 9-11 1999.
 16. 윤성호, 이상엽. DNA chip. Recent Advances in Bioprocess Engineering, Vol.6:123-136 (1998)
 17. 윤성호, 이상엽. Preparation of DNA chip. Annual Symposium of BPERC'98, KAIST, Taejon, Korea, September (1998)
 18. 이상엽. Understanding cells with DNA chip. Bioindustry News 11(1):4-5 (1998)
 19. 이상엽. Screening of new drugs by high density microplate. Bioindustry News, 11(2):6-7 (1998)

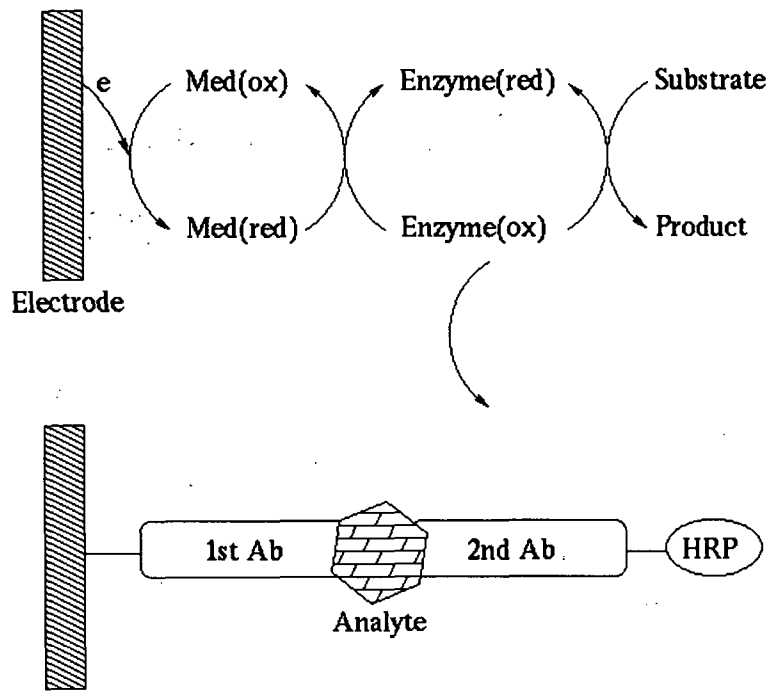


그림 3-1-1. Mediated amperometric biosensor의 원리.

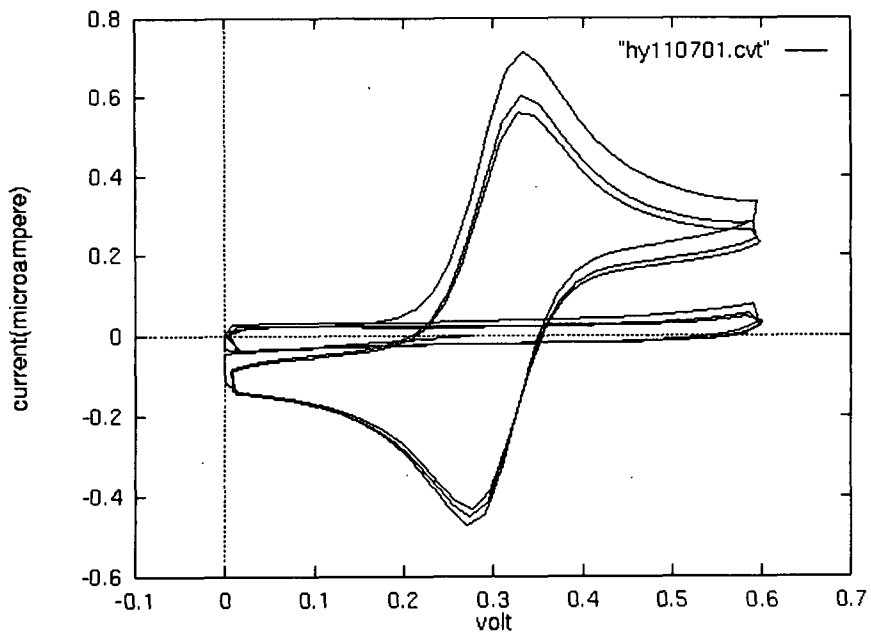


그림 3-1-2. Cyclic voltammety of ferrocenemonocarboxylic acid (FMCA)

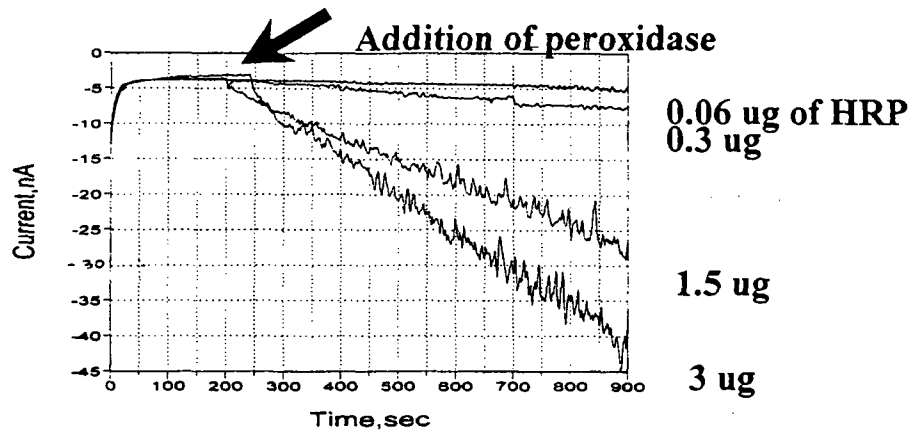


그림 3-1-3. Peroxidase 활성의 전기화학적 검출. BAS CV 50W, glassy carbon electrode, $E_{pp} = 0.0$ V vs. Ag/AgCl reference electrode, 10 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) with stirring.

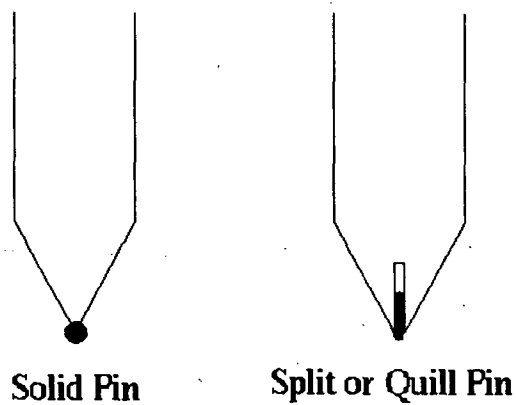


그림 3-1-4. Printing pin의 구조.

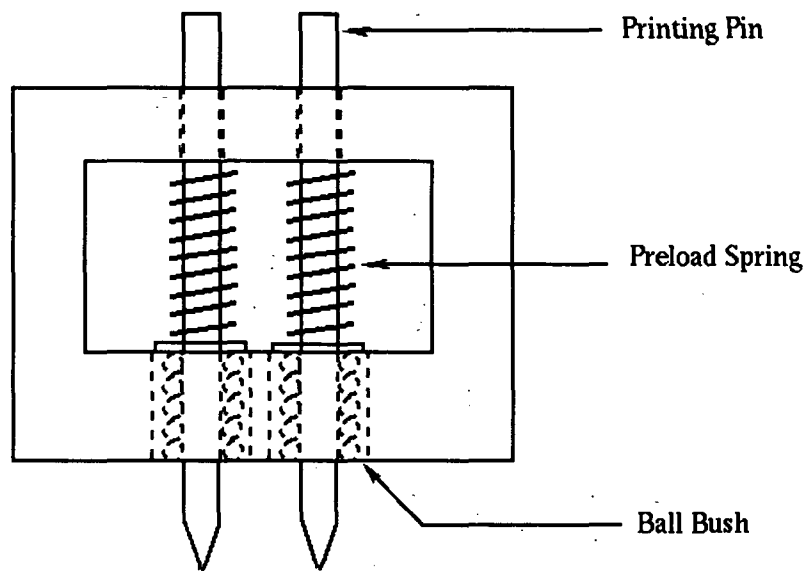


그림 3-1-5. Printing pin head assembly의 구조.

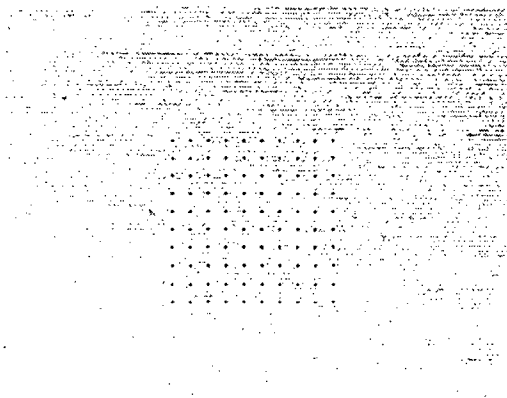


그림 3-1-6. Microarray로 인쇄한 잉크 spot들. 간격은 0.98 mm이며 틈새 간격이 0.025 mm인 핀으로 인쇄하였음.

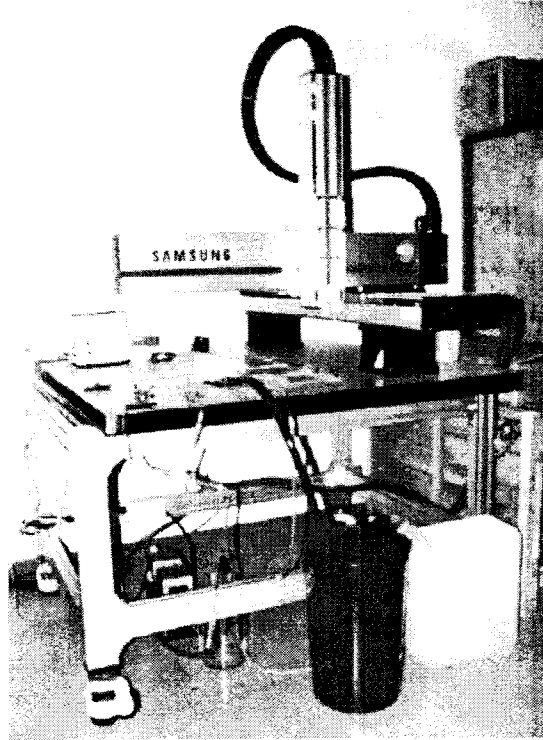


그림 3-1-7. KAIST microarrayer robot의 외관.

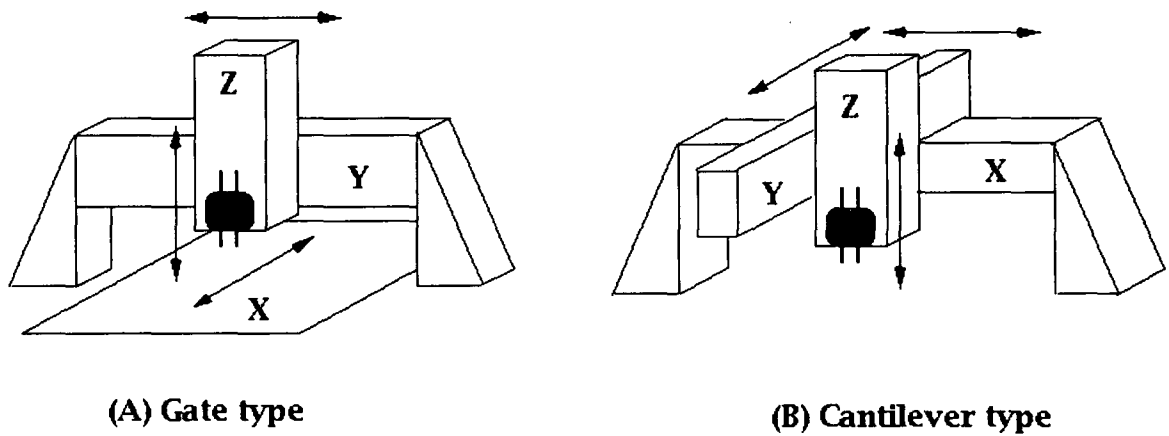


그림 3-1-8. 로봇의 운동 방식.

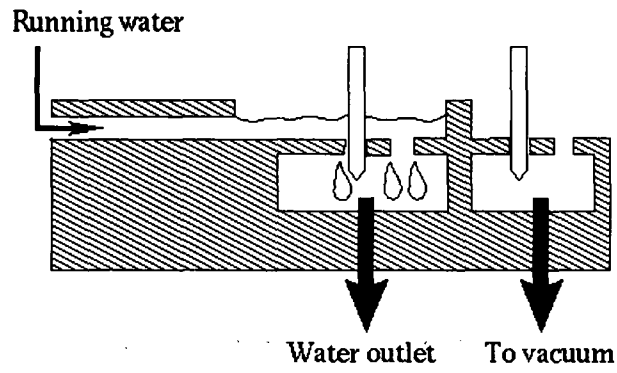


그림 3-1-9. Printing pin 세척 시스템의 작동 원리.

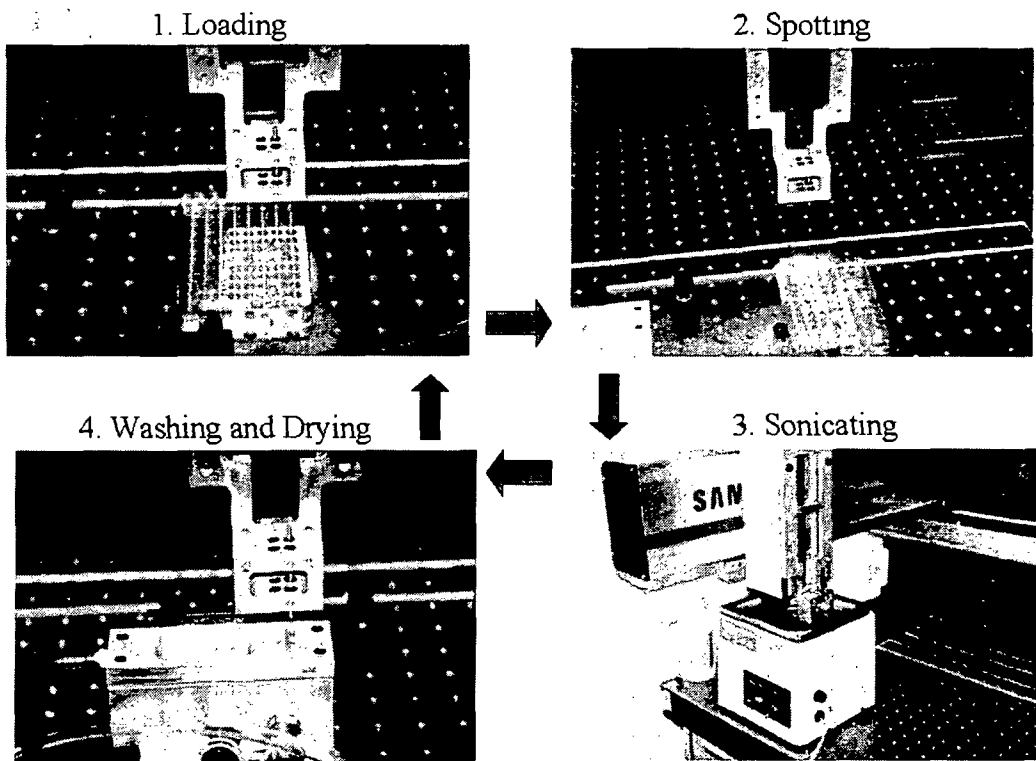


그림 3-1-10. Microarrayer의 작동 사이클.

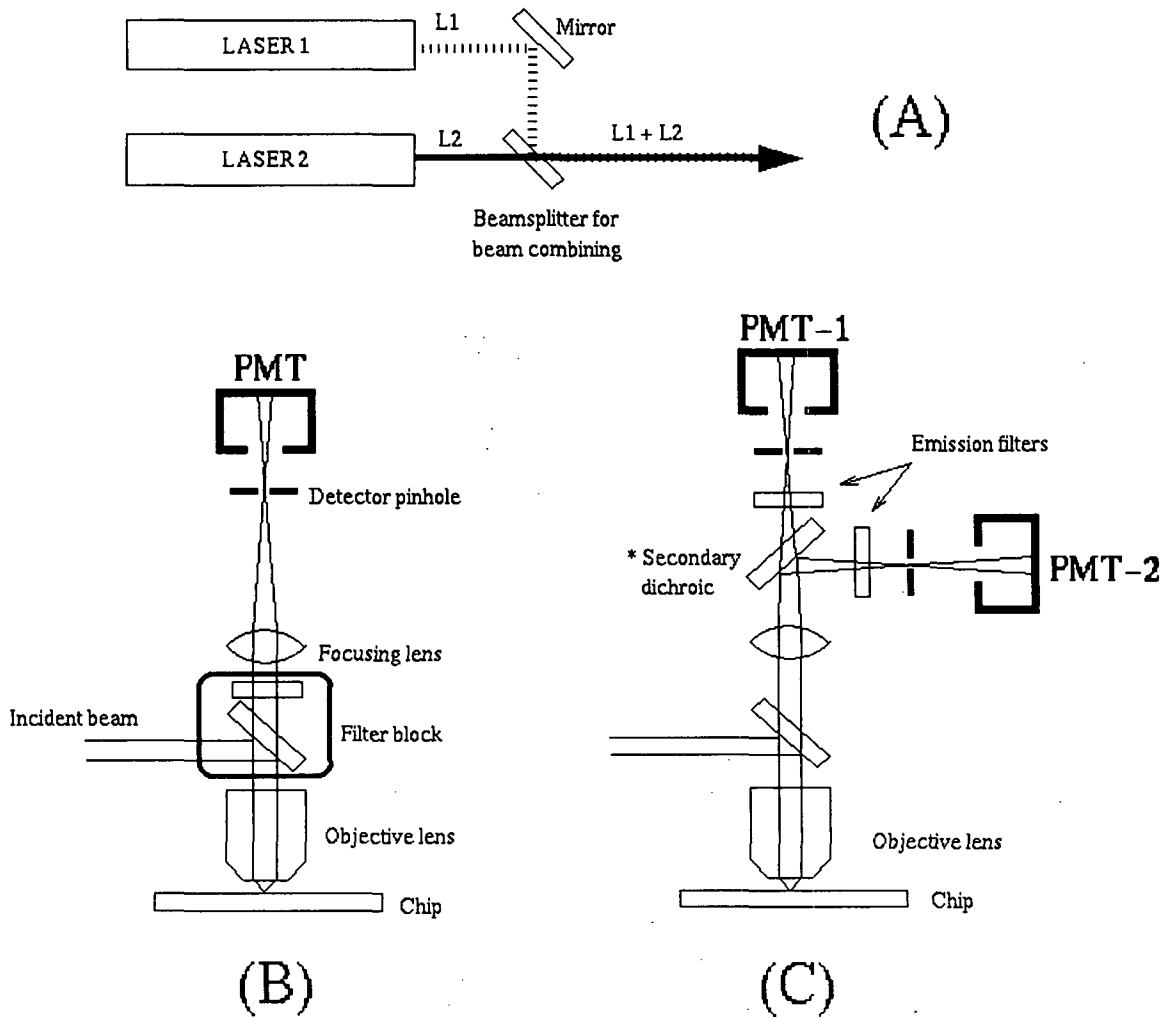


그림 3-1-11. 동시에 두 가지의 형광물질을 검출하는 confocal microscope의 원리도. (A), 레이저 광의 combination. (B), filter block을 교체하고 2회 스캐닝 하는 형태. (C), multiband dichroic 및 secondary dichroic을 사용하여 1회 스캐닝 하는 형태.

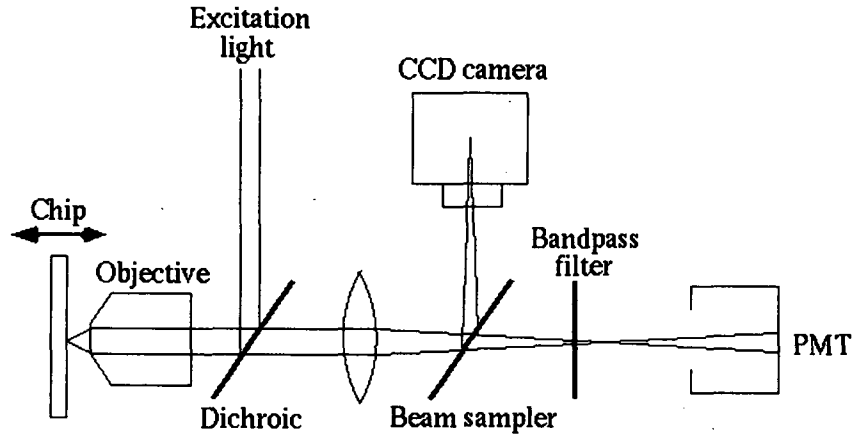


그림 3-1-12. Chip scanner의 focusing 상태 검출 기구.

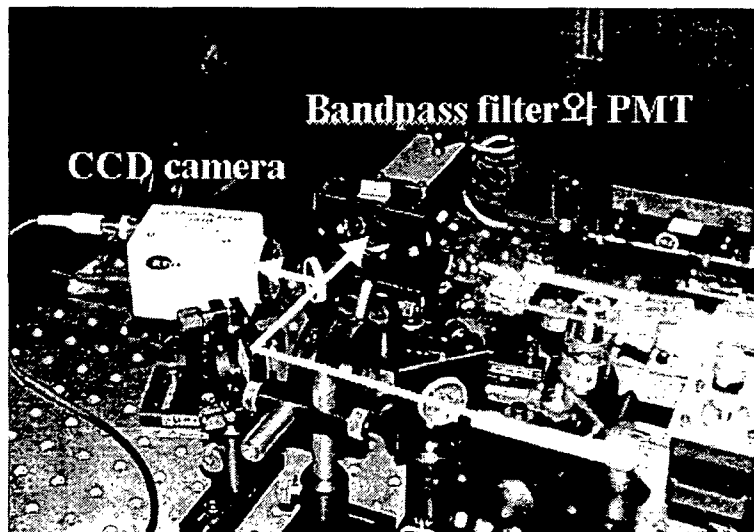


그림 3-1-13. 초점 확인용 CCD camera와 PMT 부근의 모습



그림 3-1-14. 구동 스테이지에 고정된 슬라이드 글라스의 모습

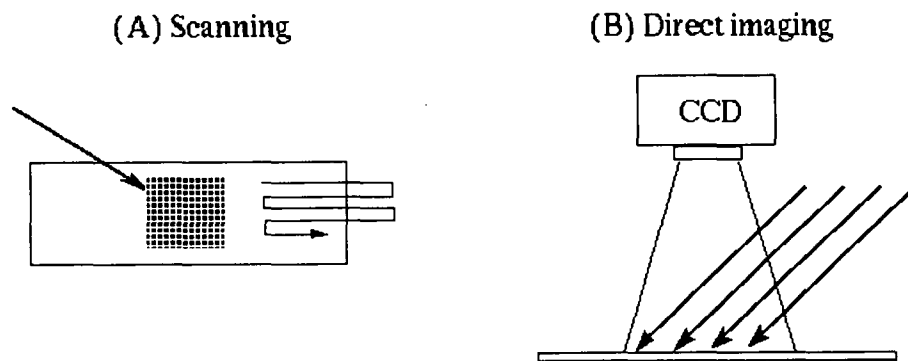


그림 3-1-15. 칩 조명 방식. (A), 칩 상에 레이저광을 포커싱 한 상태에서 칩을 움직여 스캐닝 한 다음 소프트웨어적으로 2차원 영상을 재구성함. (B), flood illumination으로 칩 전체를 고르게 비추면서 한번에 칩의 영상을 카메라로 포착함.

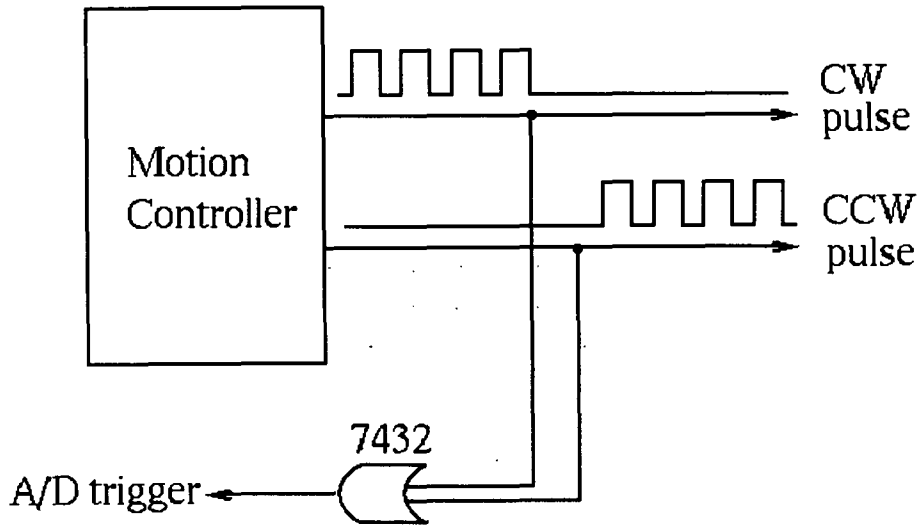
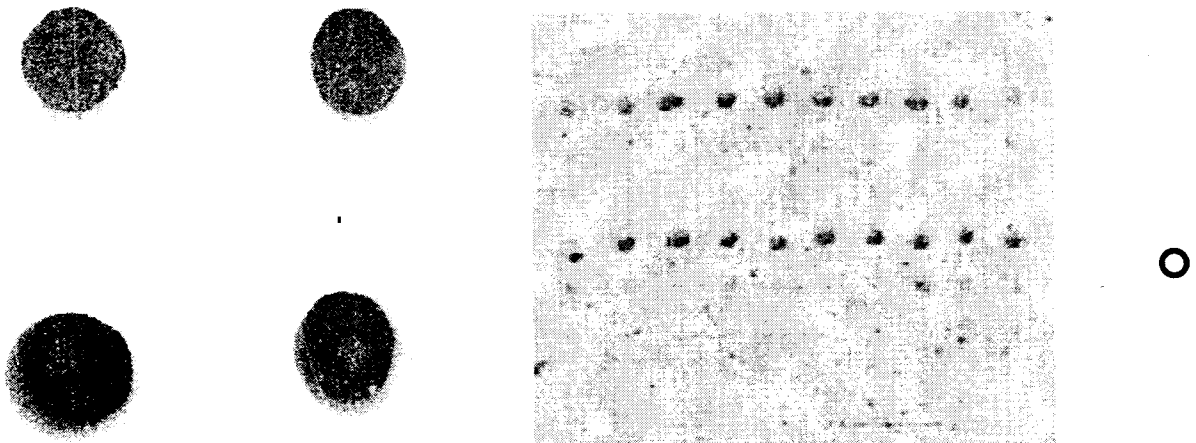


그림 3-1-16. A/D conversion용 트리거 펄스의 획득 방식.



(A)

(B)

그림 3-1-17. Biochip scanner로 얻은 영상. (A), PDC slide에 fluorescein으로 수식한 올리고머를 1 μ 씩 올려놓고 고정시킨 뒤 스캐닝 한 것. 위의 두 spot은 대조군 올리고머이고 좀 더 진하게 나타낸 아래의 것은 아민 수식 올리고머임. (B), 10 X 6으로 배열한 plasmid DNA array를 fluorescein 표지한 apoE 3 올리고머로 hybridization 한 결과. 위의 세 줄은 재조합 안티트롬빈 plasmid이고 아래의 세 줄은 재조합 apoE 3 plasmid. Spotting한 DNA 용액의 농도가 가장 높은 첫 번째 줄에서만 형광 신호가 검출됨.

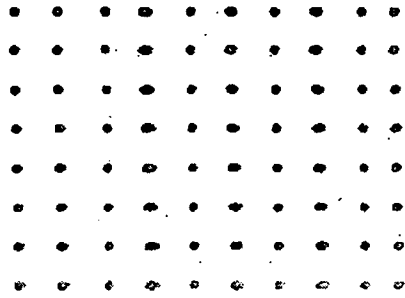


그림 3-1-18. Fluorescein으로 수식한 올리고머(17.3 pmol/ μ l in 0.2 M carbonate buffer, pH 9.0)를 microarray로 spotting 하여 스캐닝 한 것. Spot간 간격은 0.49 mm.

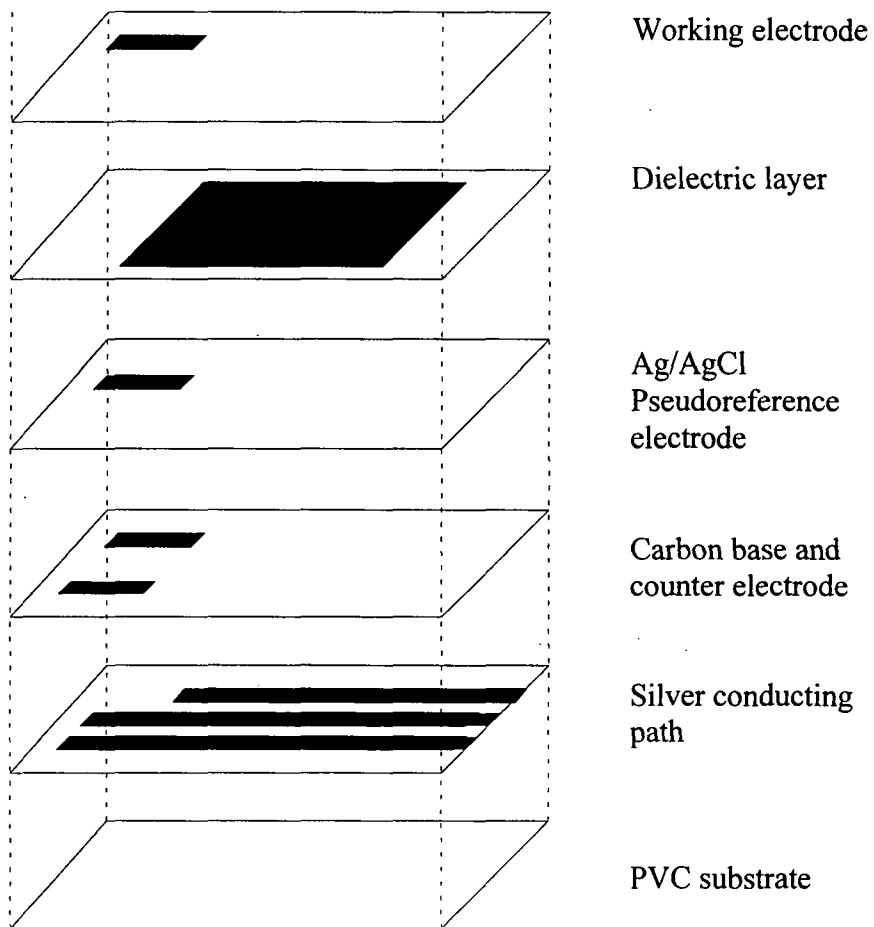


Figure 3-2-1 Fabrication steps of thick-film biosensor

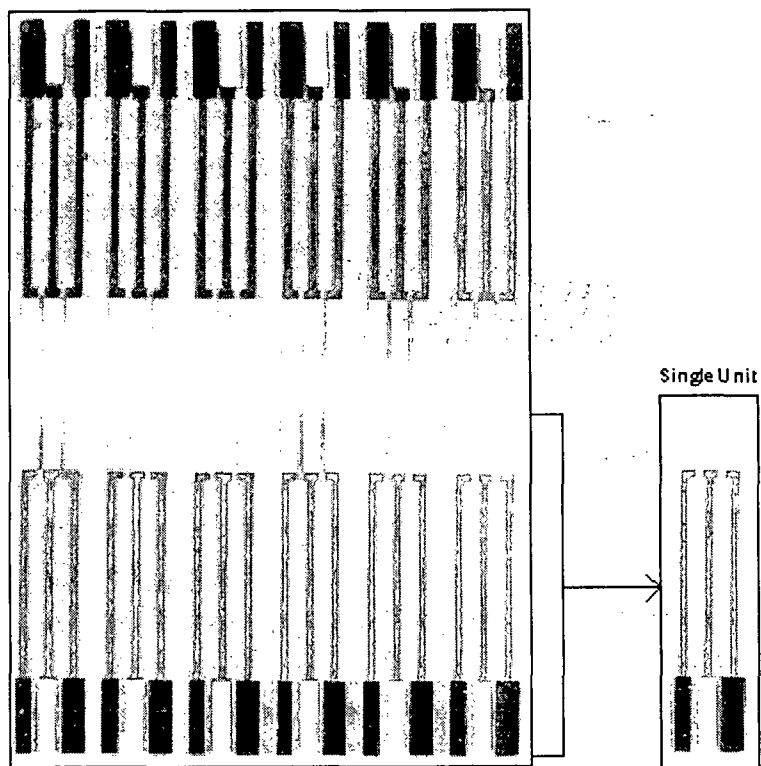


Figure 3-2-2 Thick-film biosensors fabricated by screen-printing technology

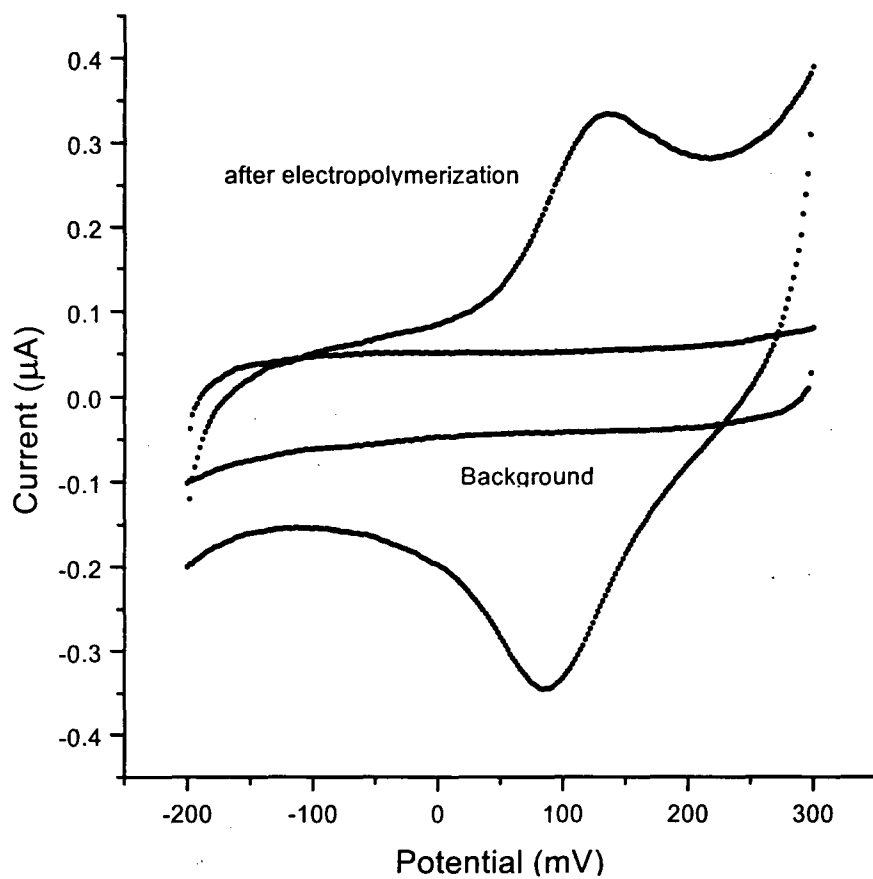


Figure 3-2-3 Cyclic voltammogram at 5 mV/s of 1 mM 3,4-DHB in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8.2) at a glassy carbon electrode

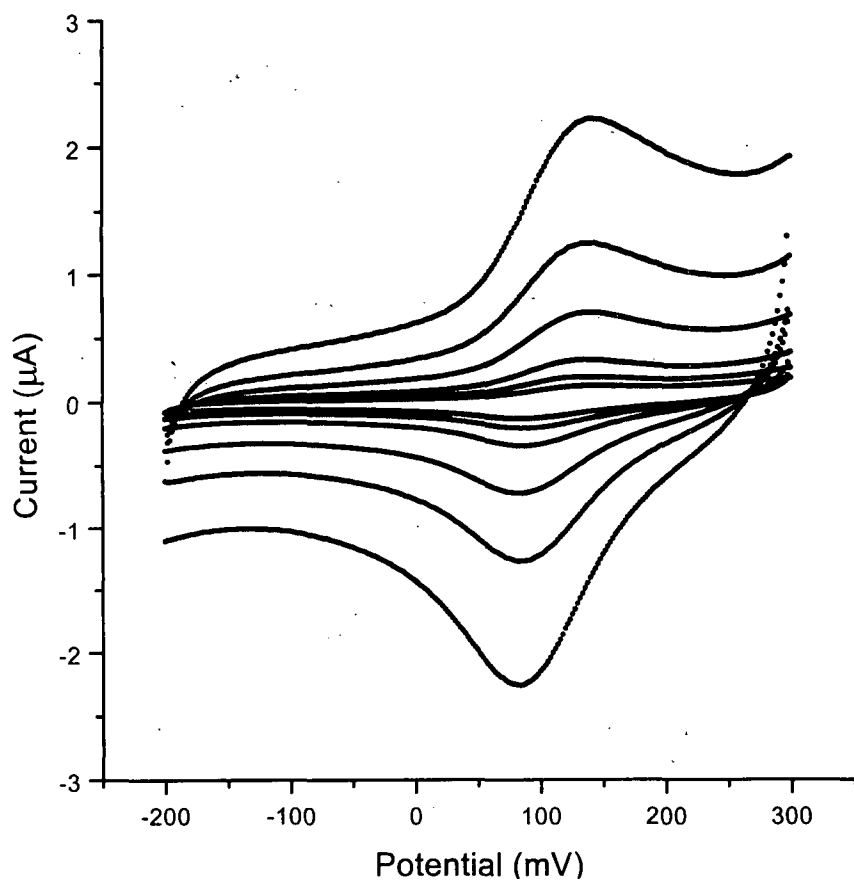


Figure 3-2-4 Cyclic voltammogram of a glassy carbon electrode modified with 3,4-DHB in potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 8.2)

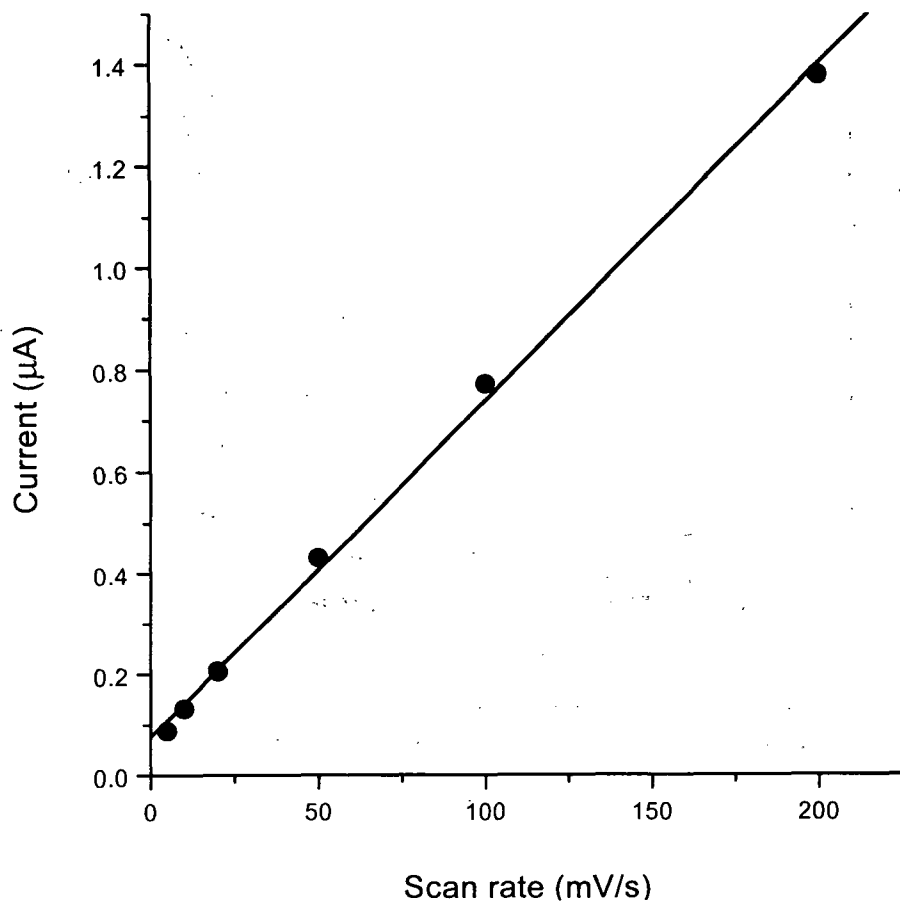


Figure 3-2-5 Plot of anodic peak current vs. scan rate at a glassy carbon electrode modified with 3,4-DHB

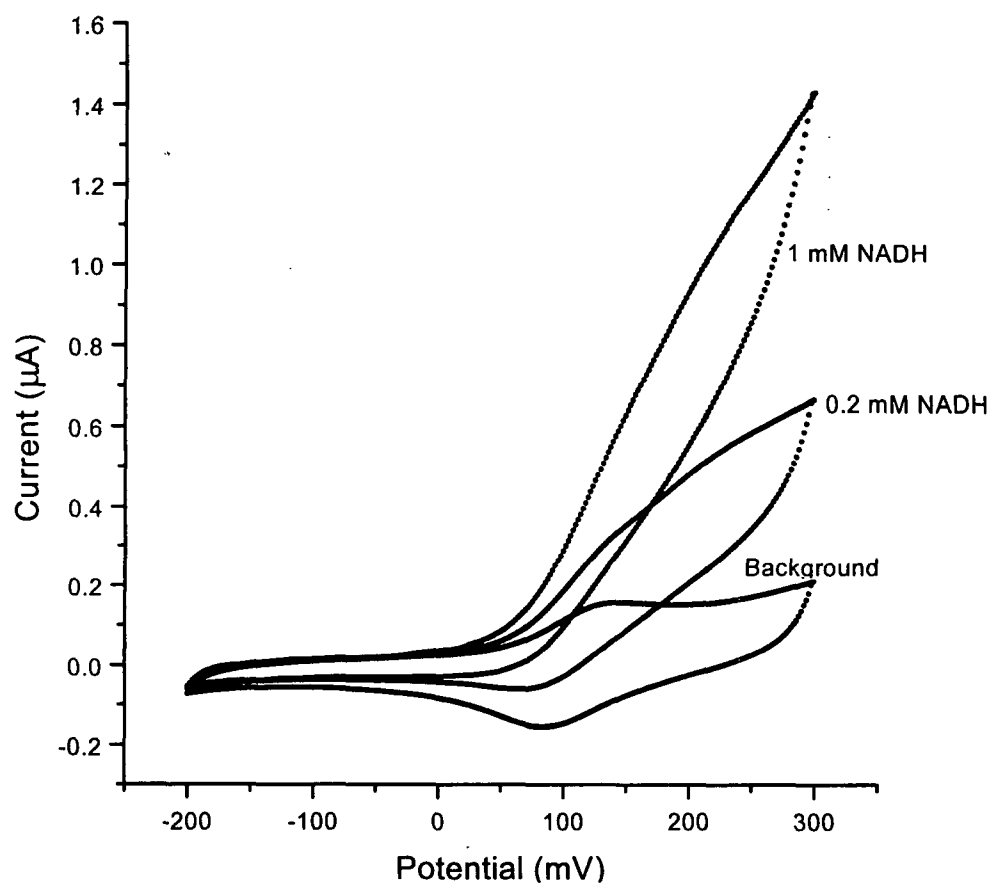


Figure 3-2-6 Electrocatalytic oxidation of NADH at a glassy carbon electrode modified with 3,4-DHB (scan rate 5 mV/s, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 8.2)

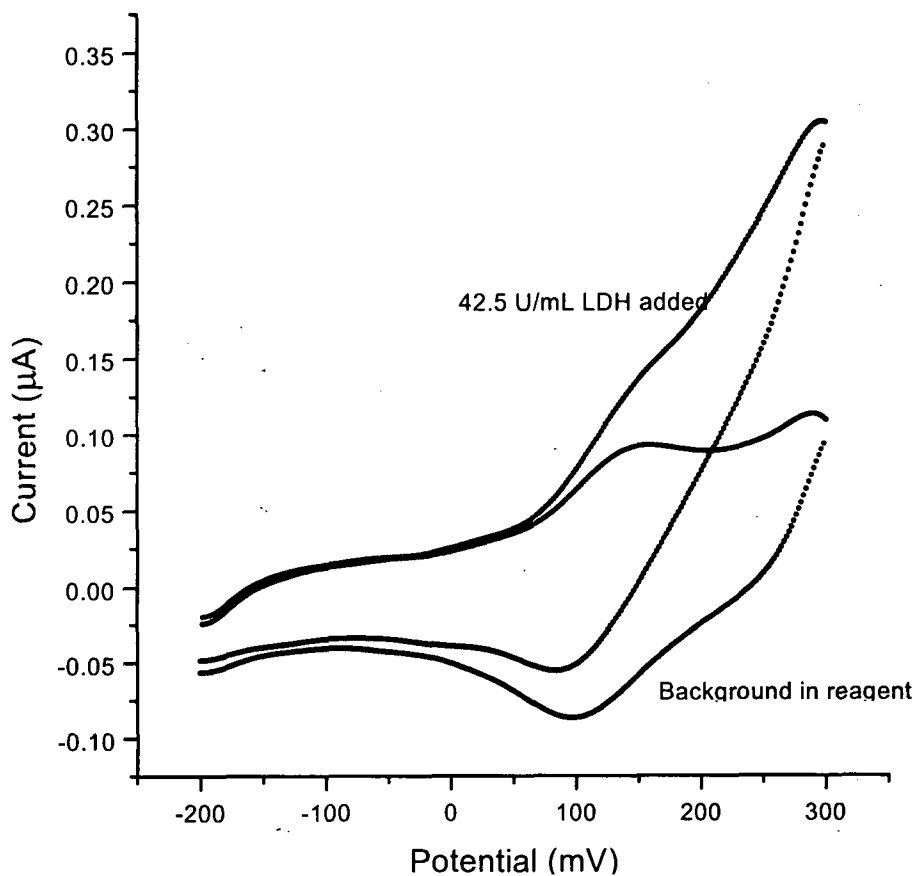


Figure 3-2-7. Electrocatalytic oxidation of NADH generated by enzyme reaction at a glassy carbon electrode modified with 3,4-DHB (scan rate 5 mV/s, 2 mg/mL of NAD^+ with 3 mg/mL of L-lactate in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 8.2)

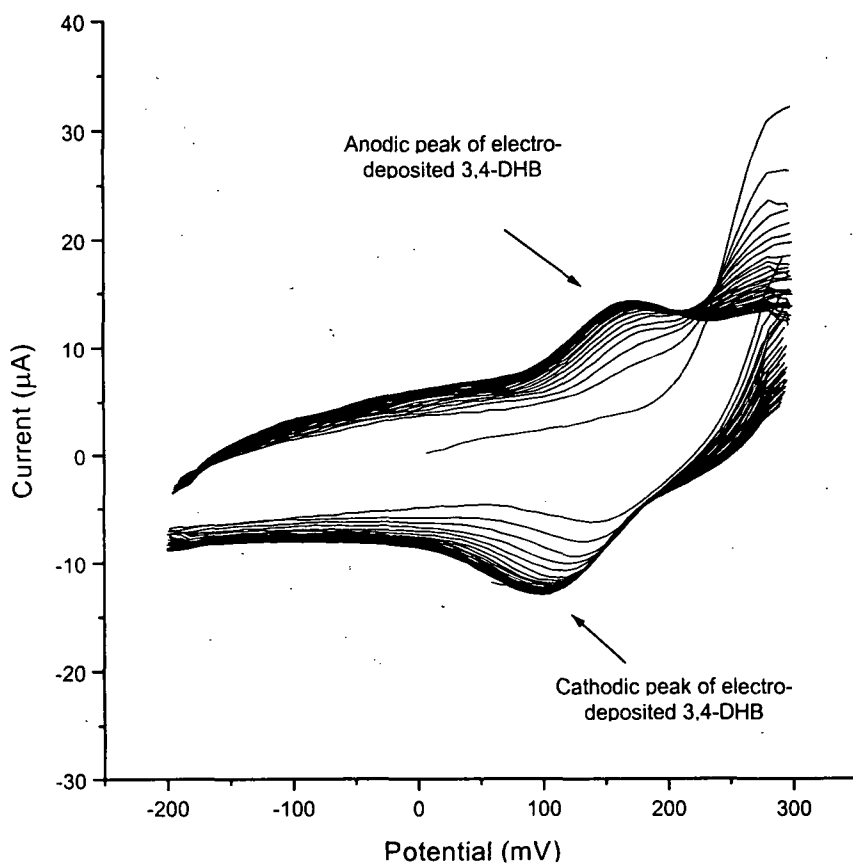


Figure 3-2-8 Immobilization process of 3,4-DHB via electrodeposition by potential cycling between -200 mV and +300 mV at 20 mV/s. (in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 8.2)

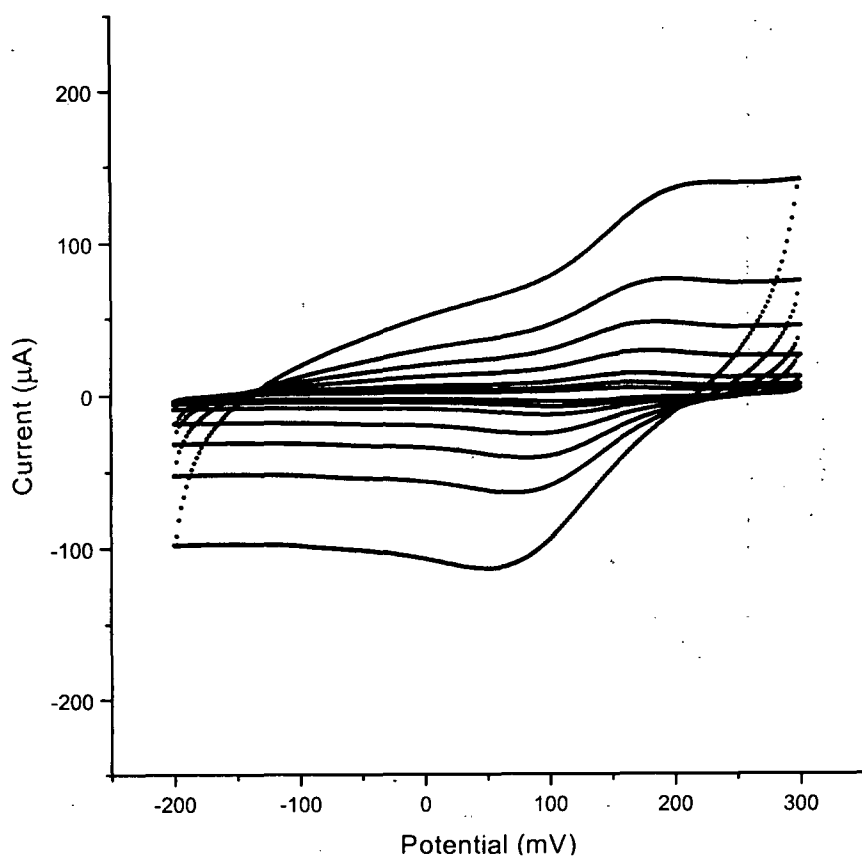


Figure 3-2-9 Cyclic voltammograms of electrodeposited 3,4-DHB at a thick-film biosensor with various scan rates; (a) 20 mV/s, (b) 50 mV/s, (c) 100 mV/s, (d) 200 mV/s, (e) 500 mV/s

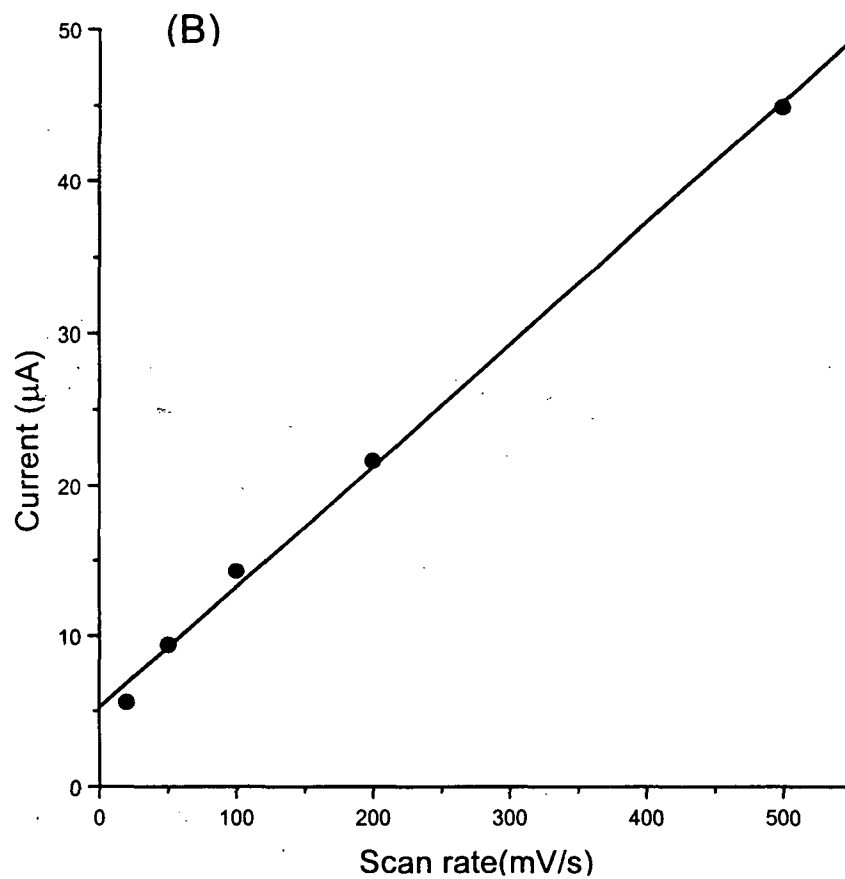


Figure 3-2-10 Dependency of anodic peak current on scan rate at a thick-film biosensor modified with 3,4-DHB

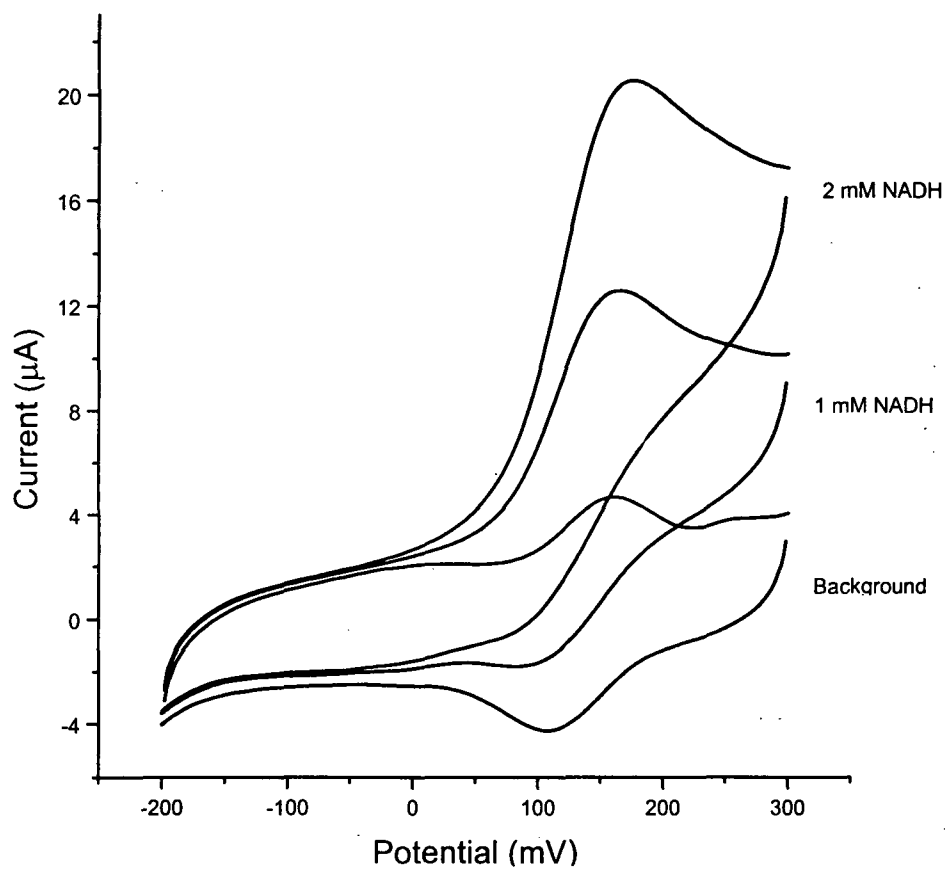


Figure 3-2-11 Electrocatalytic oxidation of NADH at a thick-film biosensor modified with 3,4-DHB (scan rate 5 mV/s, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 8.2)

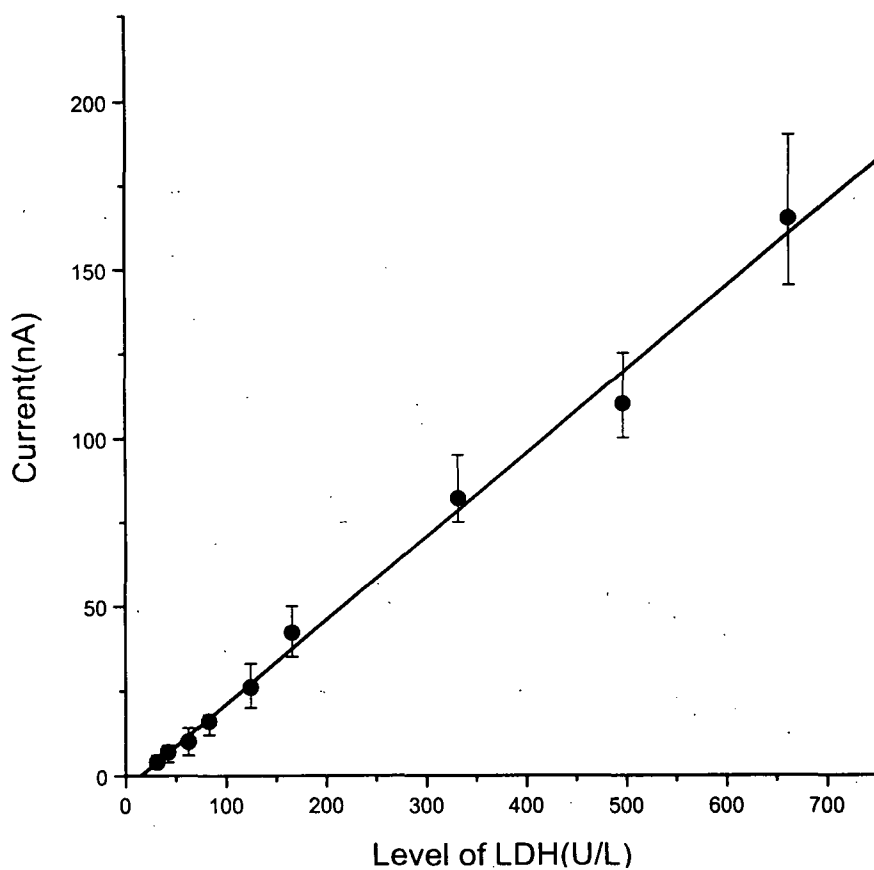


Figure 3-2-12 Calibration curve for lactate dehydrogenase level by using thick-film biosensors. (n=5)

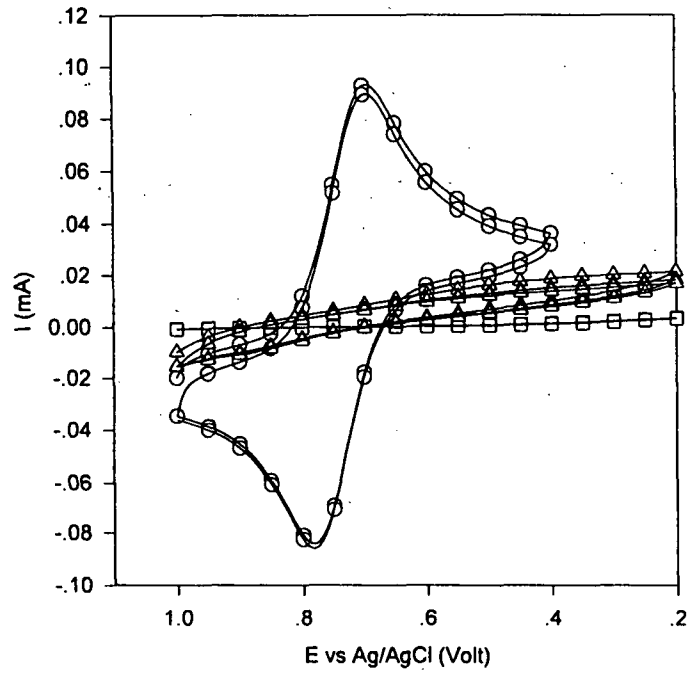


그림 3-3-1. Cyclic voltammograms of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

(a) --○-- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ /Au in 1 M KCl

(b) --□-- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ / $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$ /Au in 1 M KCl

(c) --△-- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ / NH_2PhSH /Au in 1 M KCl

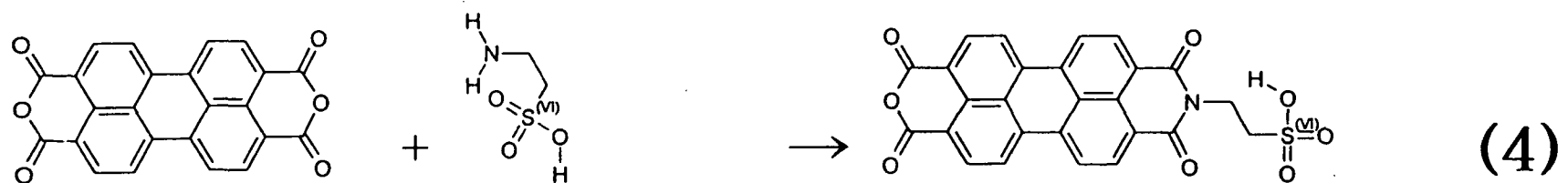
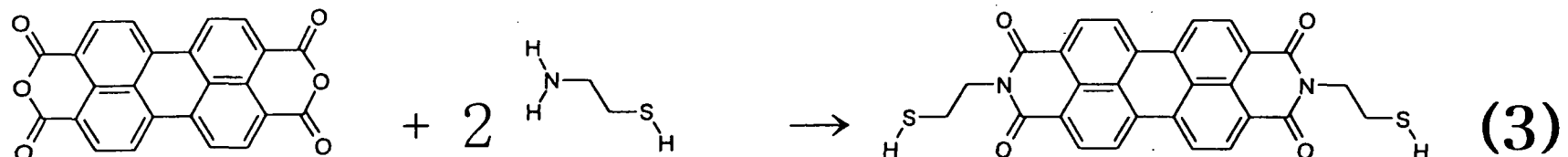
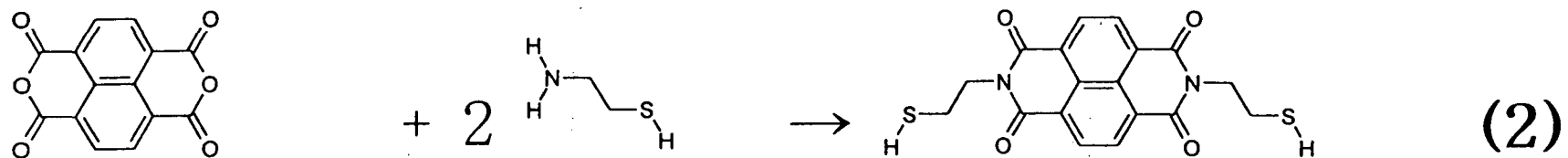
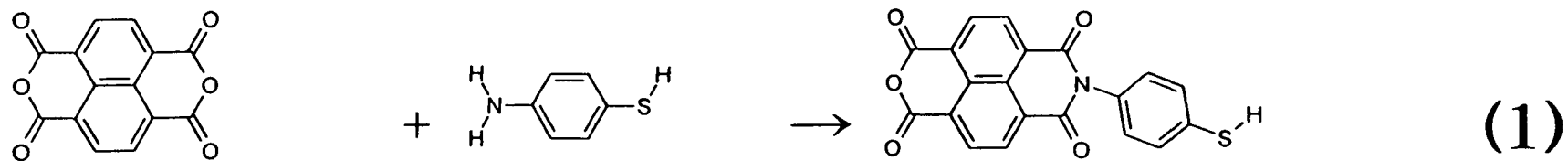


그림 3-3-2. Synthesis of redox thiol molecules.

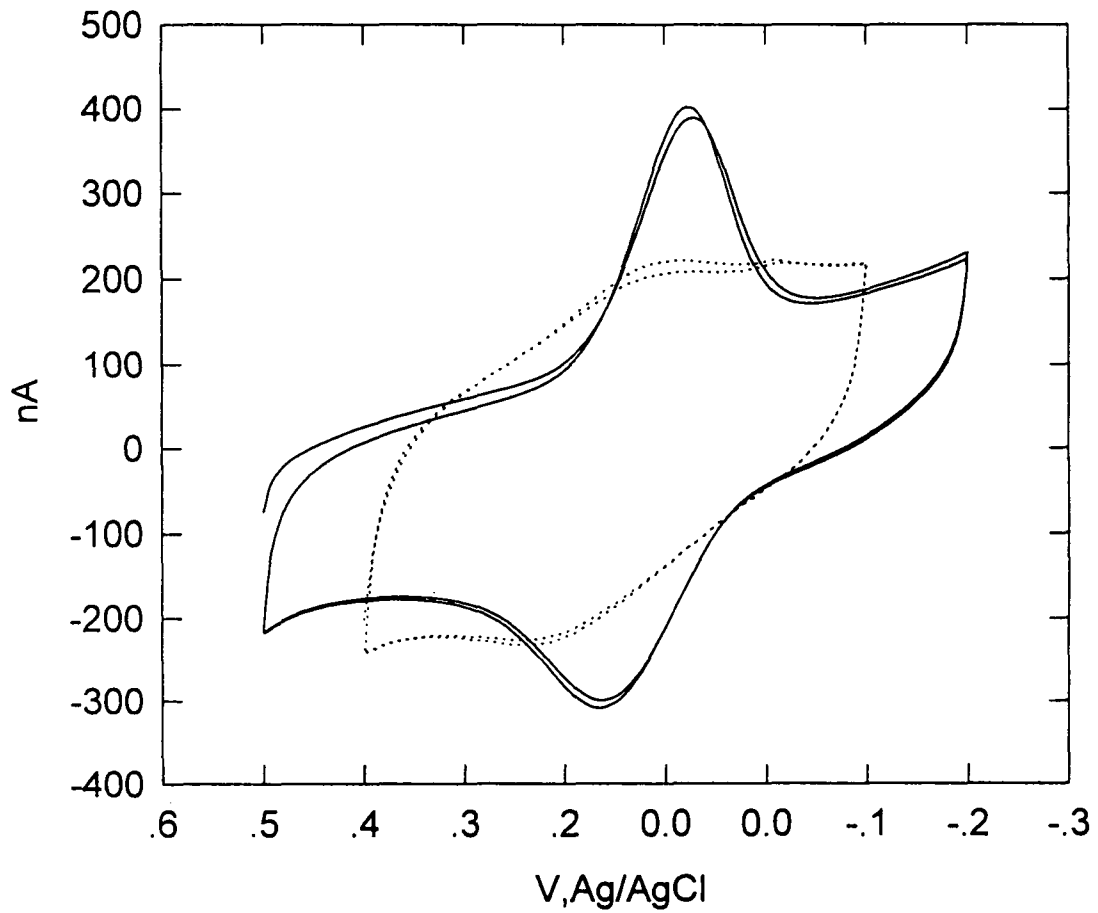


그림 3-3-3. Cyclic voltammograms of cytochrome c at gold electrode with 3-mercaptopropionic acid self assembled monolayer (solid line), and of SAM (dot line)

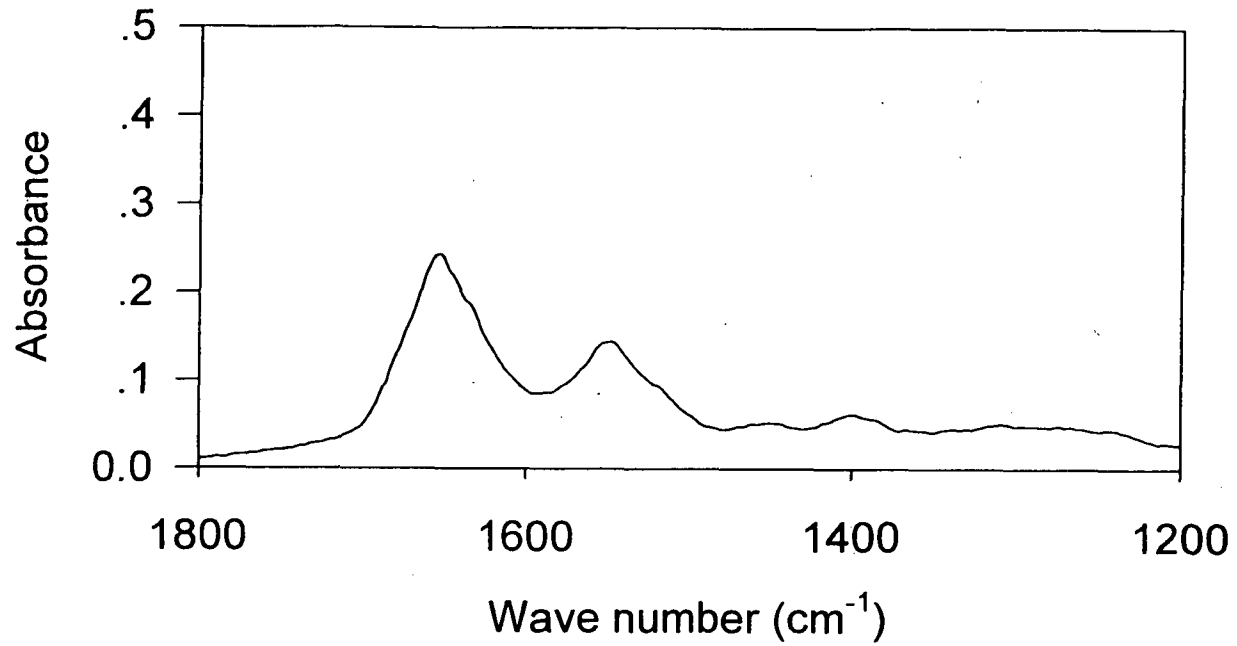


그림 3-3-4. Infrared spectra of horse cytochrome c 10 mM. Reference was the spectrum of the cell containing water alone.

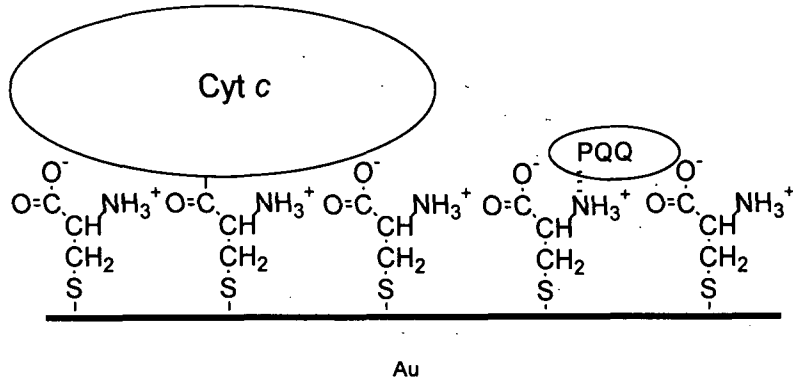


그림 3-3-5. Cyt c 와 PQQ 가 결합되어 있는 L-cysteine 자기조립 단분자 층의 모식도.

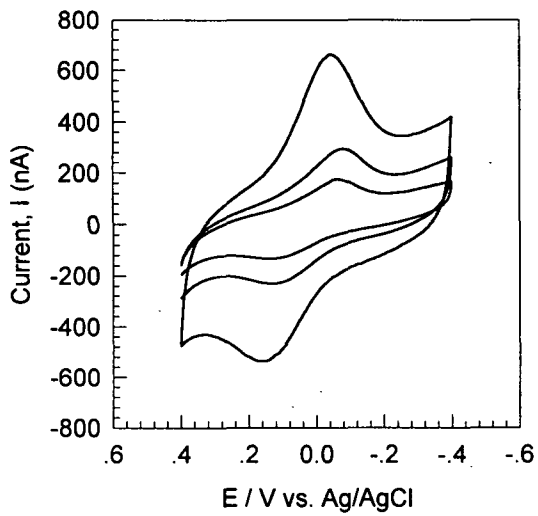


그림 3-3-6. L-cysteine의 자기조립 단분자 층에 공유결합으로 연결되어 있는 cytochrome c의 cyclic voltammogram. 주사속도: 10, 20, 50 mV/sec.

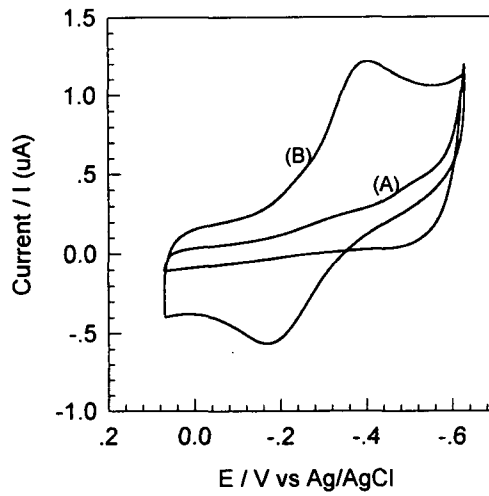


그림 3-3-7. (A) L-cysteine 자기조립 단분자층의 cyclic voltammogram: (b) L-cysteine 자기조립 단분자층에 PQQ가 전기적 인력으로 결합되어 있는 전극의 cyclic voltammogram. 주사속도: 20 mv/sec.

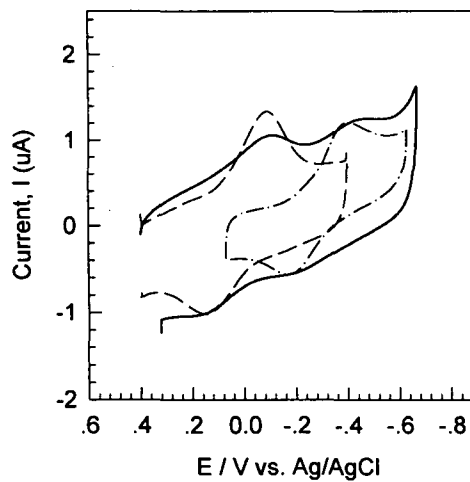


그림 3-3-8. cytochrome c 와 공유결합으로 PQQ가 전기적 인력으로 동시에 L-cysteine 자기조립 단분자층에 동시에 결합되어 있는 경우(—), cytochrome c 만 공유결합으로 결합되어 있는 경우 (— —), PQQ 만 전기적 인력으로 결합되어 있는 경우 (-•-•-)의 cyclic voltammogram.

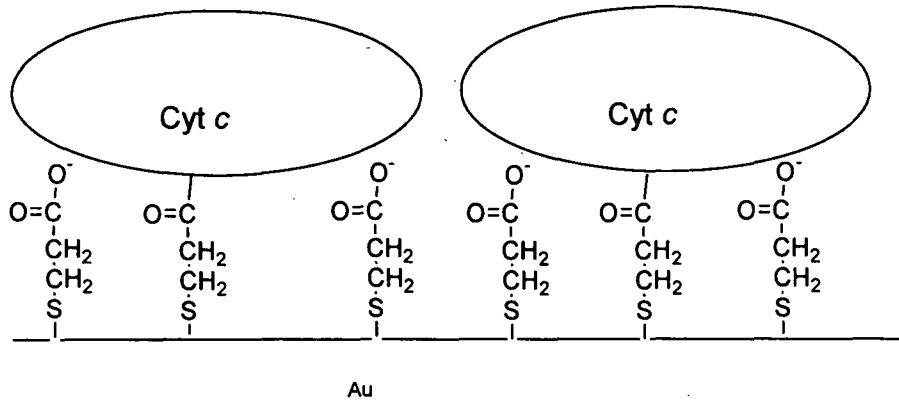


그림 3-3-9. cytochrome c 를 mercaptopropionic acid/Au 에 공유결합으로 연결한 전극의 모식도.

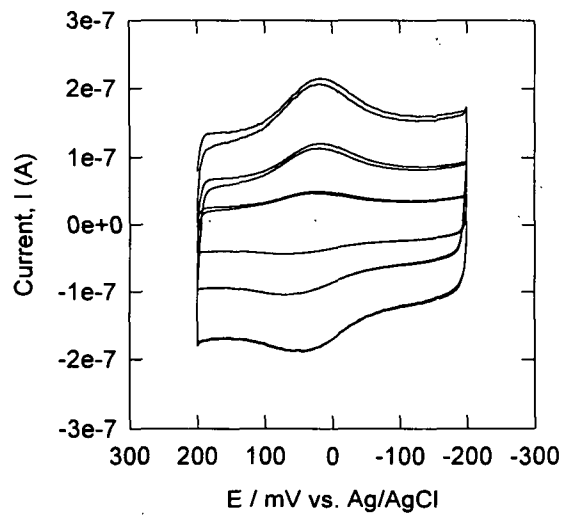


그림 3-3-10. cytochrome c/Mercaptopropionic acid/Au 전극의 cyclic voltammogram.

주사속도 : 20, 50, 100 mV/sec.

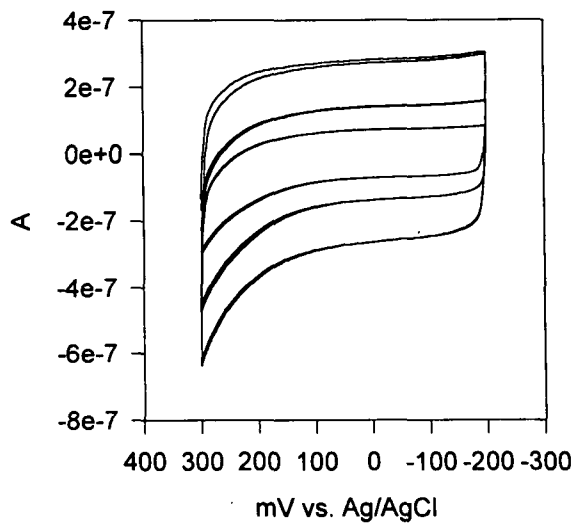
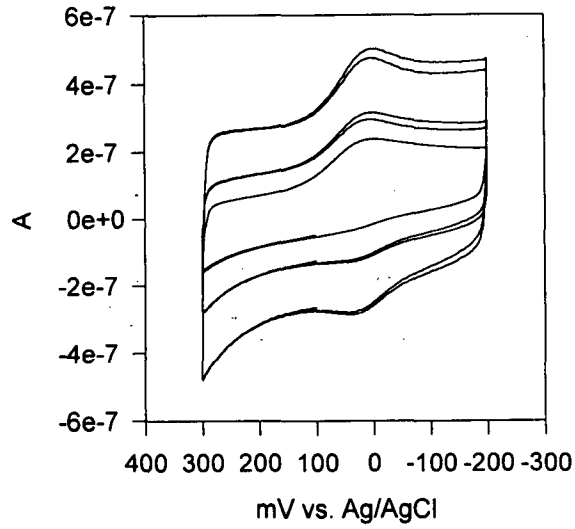


그림 3-3-11. (a) 용액중에 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 가 존재하는 경우 cytochrome c/Mercaptopropionic acid/Au 전극(위)와 (b) Mercaptopropionic acid/Au 전극(아래)의 cyclic voltammogram. 주사속도 : 50, 100, 200 mV/sec

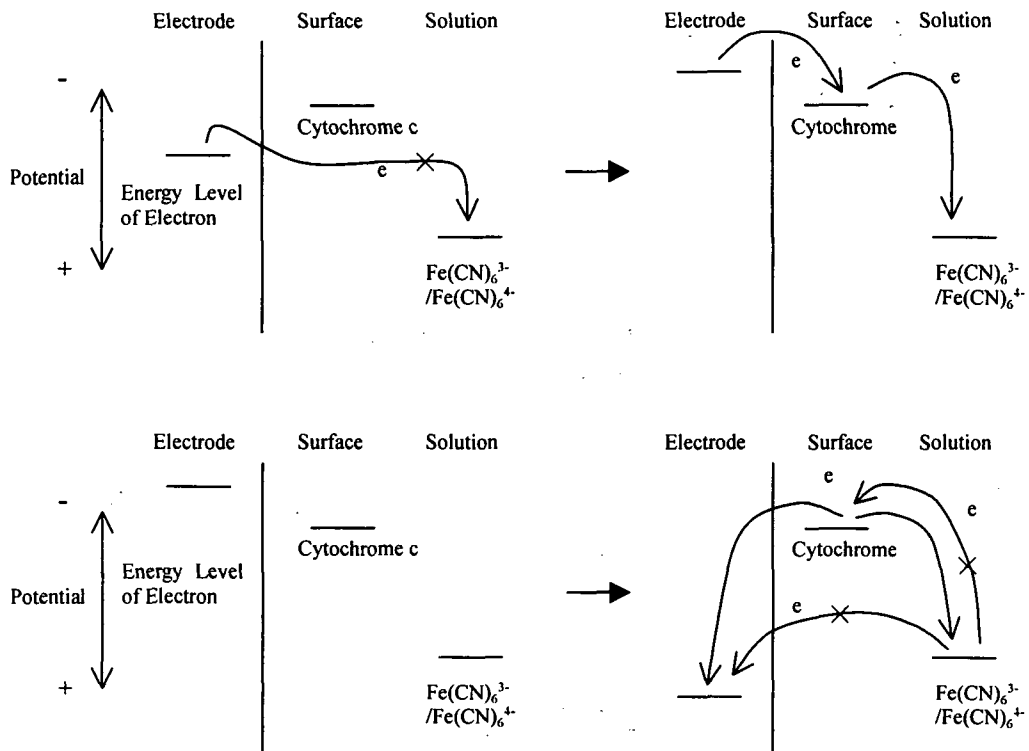


그림 3-3-12. 용액 중에 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 가 존재하는 경우 cytochrome c/Mercaptopropionic acid/Au 전극에서 에너지 준위와 전자 전달 계구의 모식도.

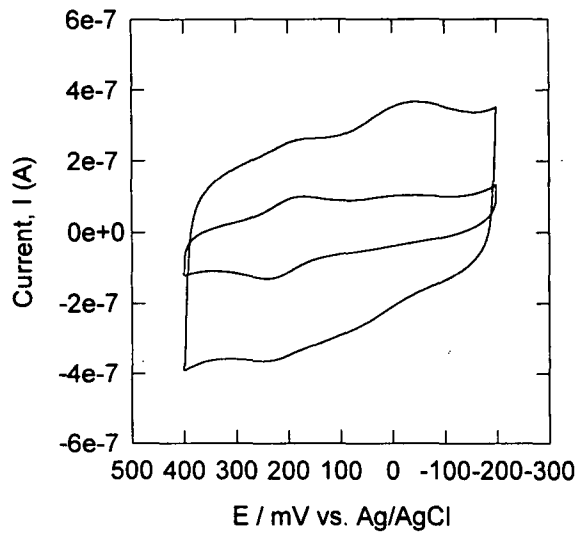


그림 3-3-13. 용액중에 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 가 존재하는 경우 cytochrome c/L-cystein/Au 전극의 cyclic voltammogram. 주사속도 : 10, 50 mV/sec.

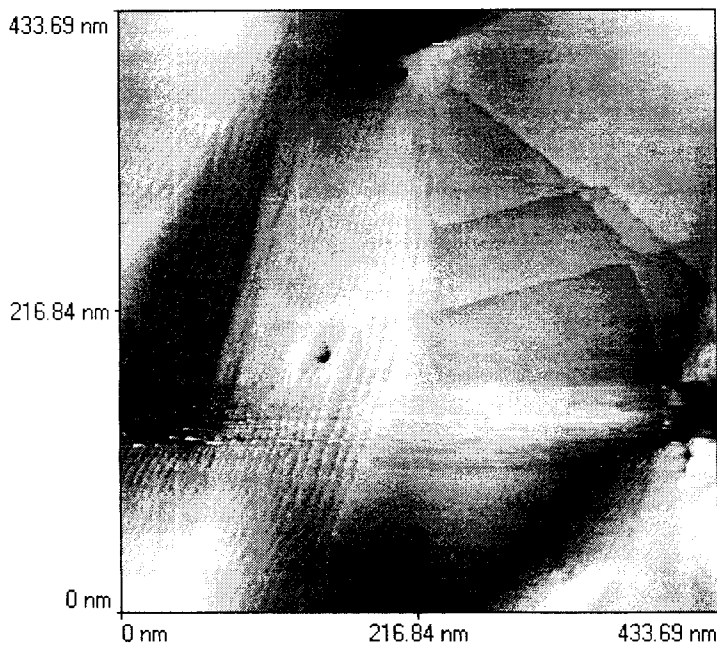


그림 3-3-14. 공기 중에서 얻은 Au(111) 단결정의 STM 이미지. $I_{\text{tip}} = 2 \text{ nA}$; $E_{\text{bias}} = 100 \text{ mV}$.

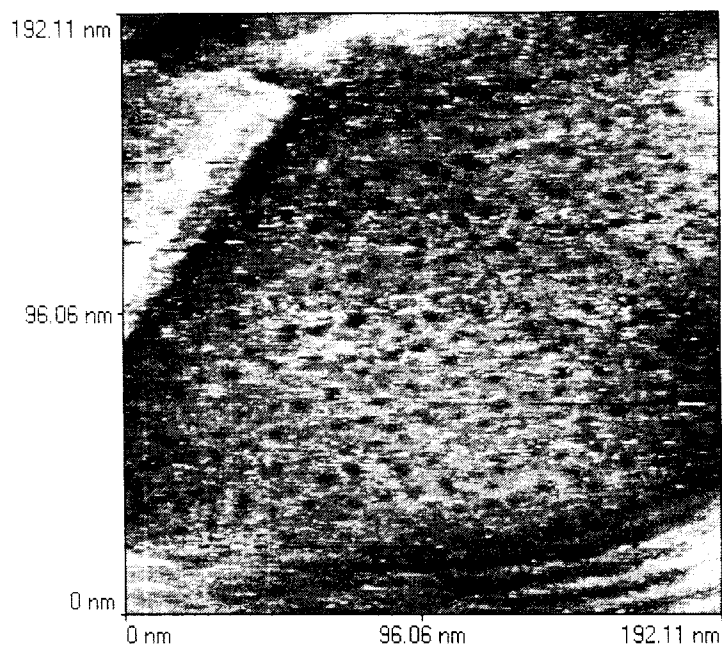


그림 3-3-15. 공기 중에서 $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOH} / \text{Au}(111)$ 의 STM 이미지. $I_{\text{tip}} = 2 \text{ nA}$; $E_{\text{bias}} = 150 \text{ mV}$.

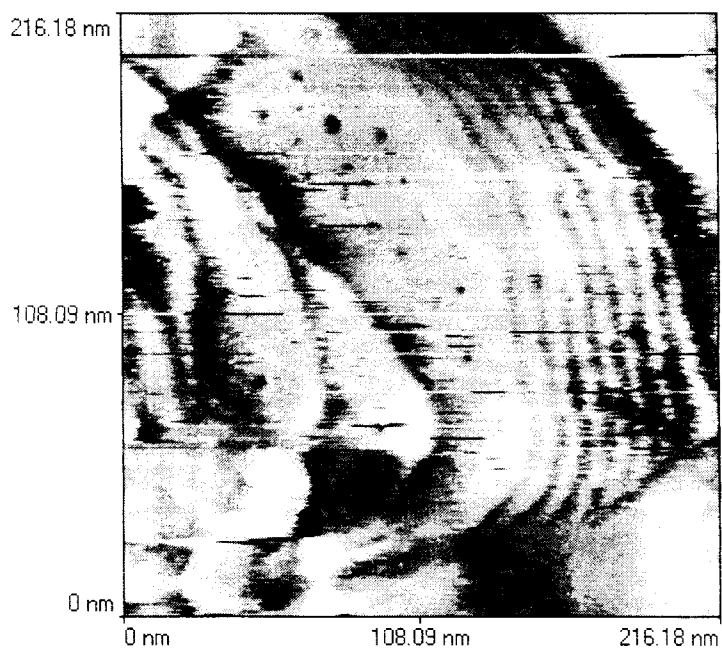
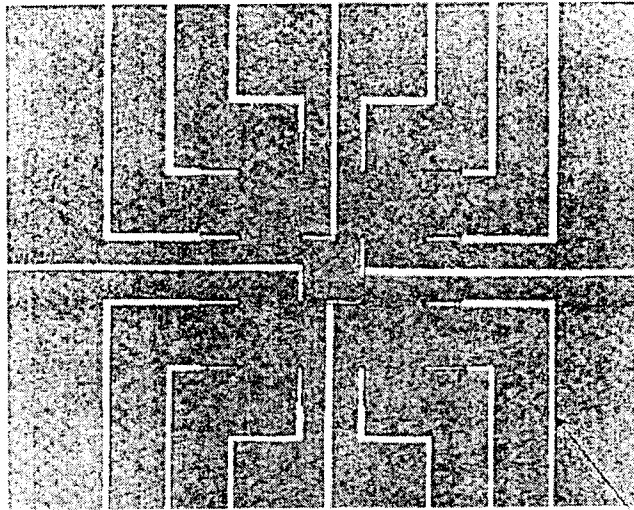
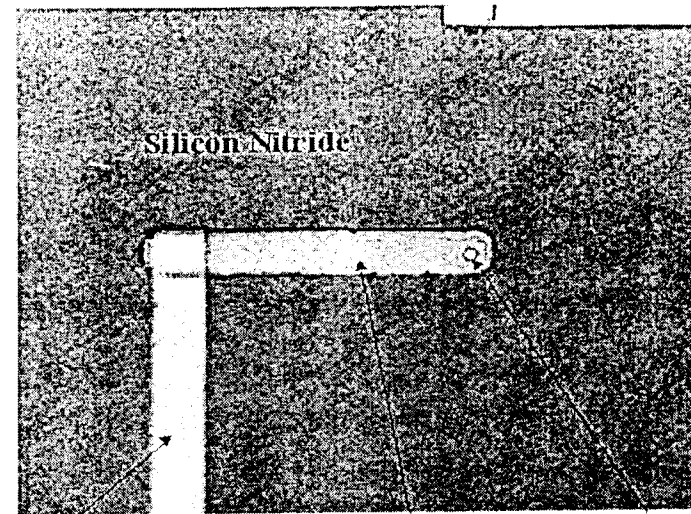


그림 3-3-16. 공기 중에서 $\text{cyto. c} / \text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOH} / \text{Au}(111)$ 의 STM 이미지. $I_{\text{tip}} = 1 \text{ nA}$; $E_{\text{bias}} = 120 \text{ mV}$.

□ Array of microelectrodes



□ Magnified Photo of electrode

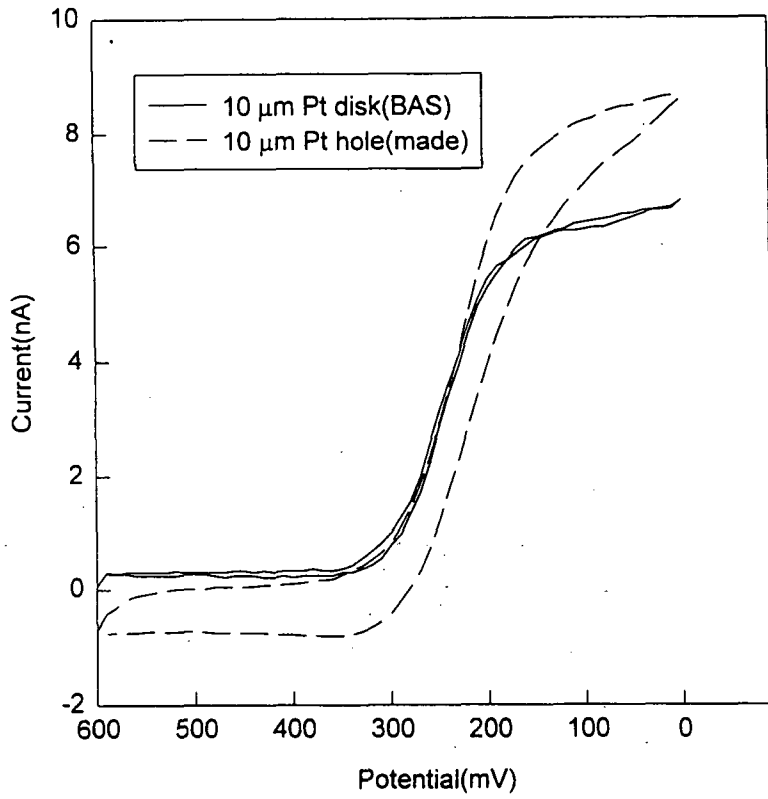


Gold connecting Wire

Platinum

Hole for electrode
(radius = 3 um)

그림 3-3-17. Fabrication of electrode arrays for experiments.



R.E : Ag/AgCl, 3M NaCl
 $C_{K_3Fe(CN)_6} = 5mM$
 $v=20mV/sec$
 0.5M KCl as support electrolyte

그림 3-3-18. Current-potential curves for 10 μm electrodes

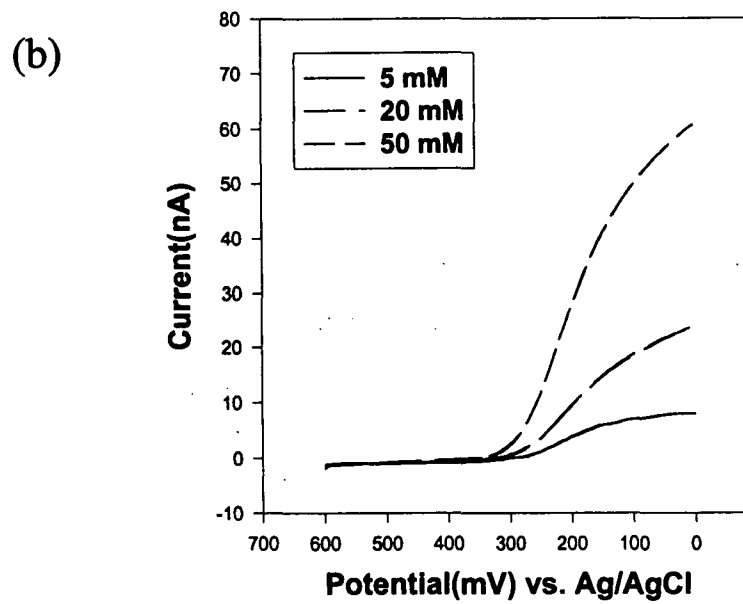
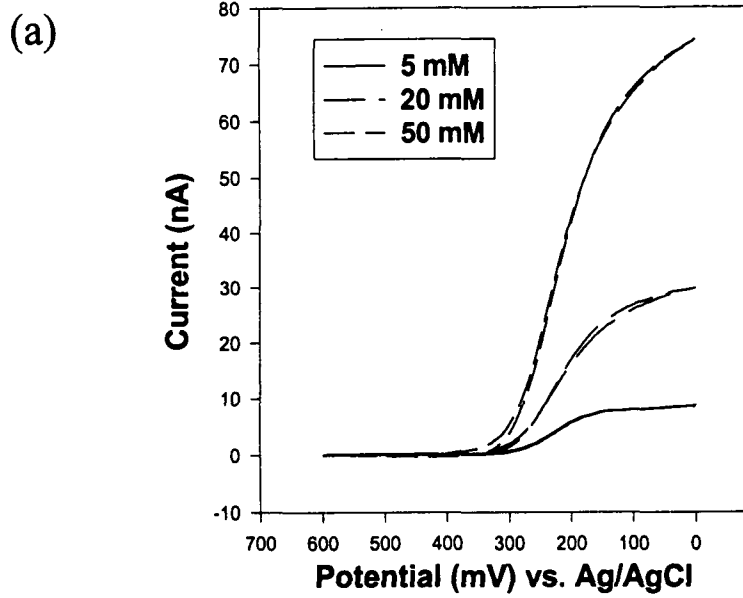


그림 3-3-19. $K_3Fe(CN)_6$ 농도 변화에 따른 cyclic voltammograms
(a) $d=10\ \mu m$ BAS 표준 전극, (b) $d=10\ \mu m$ 제작 전극. KCl 0.5 M

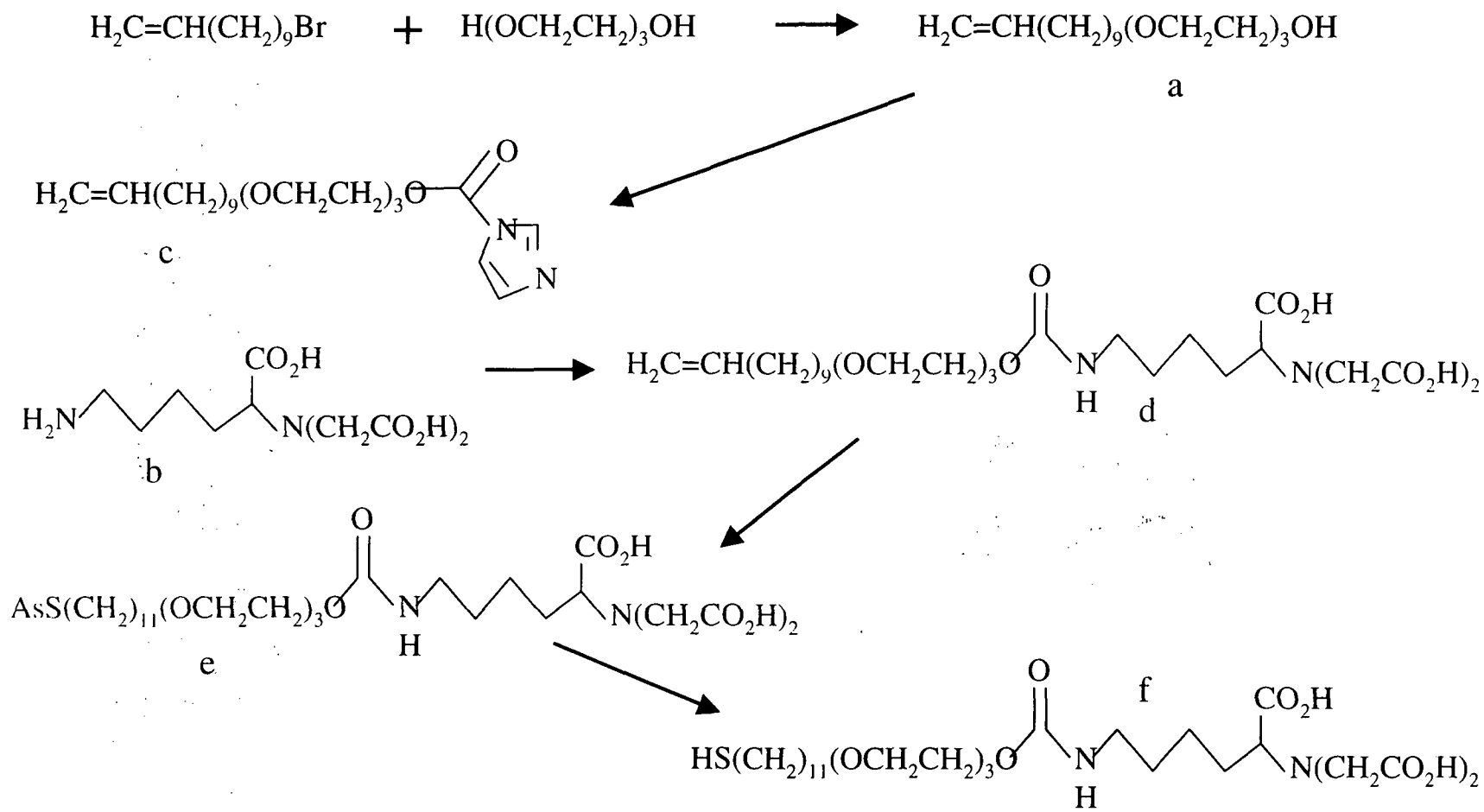


그림 3-4-1 NTA-terminated thiol 의 합성

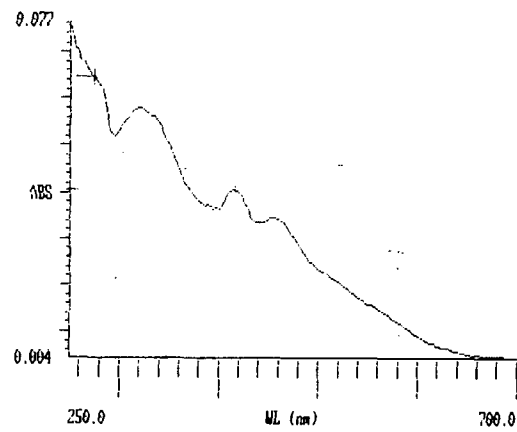
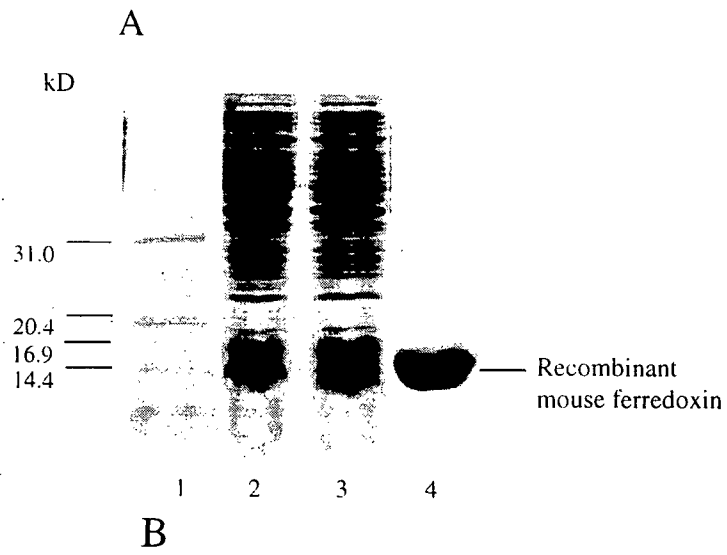


그림 3-4-2. 재조합 fusion mouse ferredoxin 의 정제와 정제된 단백질의 UV-visible spectra. (A) Overexpression 과 정제. Lane 1: size marker, lane 2: 1 mM IPTG 에 의해서 induction 된 total cell protein, lane 3: no induction, lane 4: Ni-affinity column 에 의해서 정제된 mouse ferredoxin (14.6kD), (B) UV-visible spectra. 1 cm quartz cell 을 사용, 8.8 mM phosphate buffer pH 7.0, ferredoxin 의 농도는 약 10 μ M.

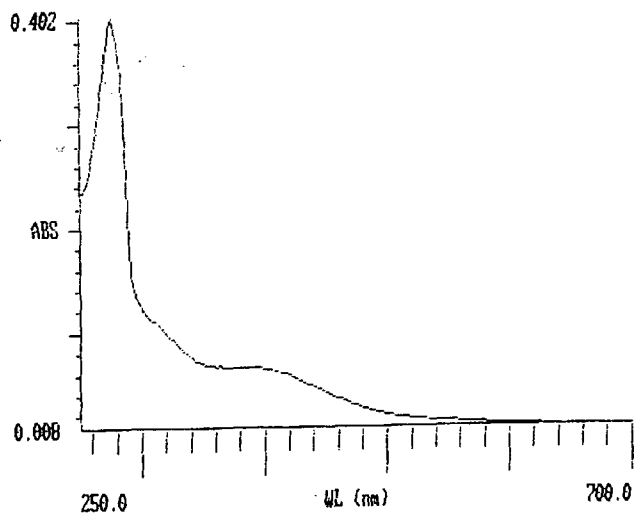
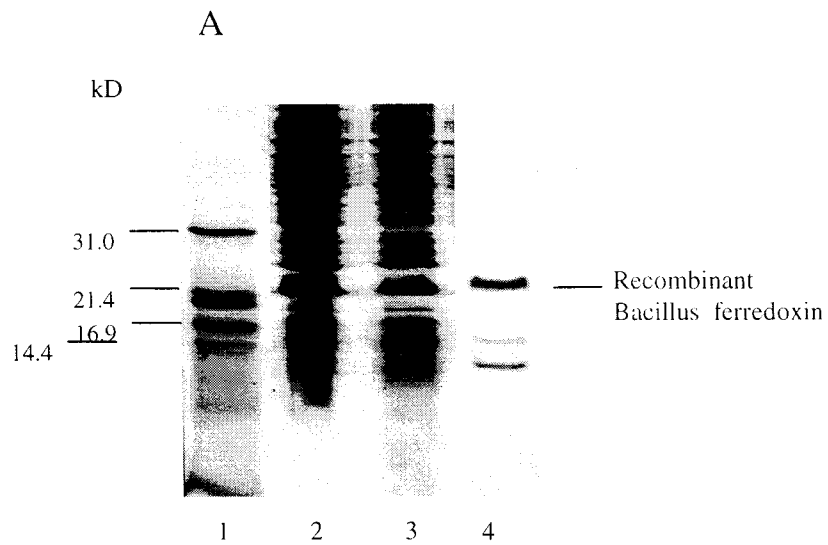


그림 3-4-3. 재조합 재조합 fusion *Bacillus ferredoxin* 의 정제와 정제된 단백질의 UV-visible spectra. (A) Overexpression 과 정제. Lane 1: size marker. lane 2: 1 mM IPTG 에 의해서 induction 된 total cell protein, lane 3: no induction. lane 4: Ni-affinity column 에 의해서 정제된 *Bacillus ferredoxin*. (B) UV-visible spectra. 1 cm quartz cell 을 사용. 8.8 mM phosphate buffer pH 7.0. ferredoxin 의 농도는 약 10 μ M.

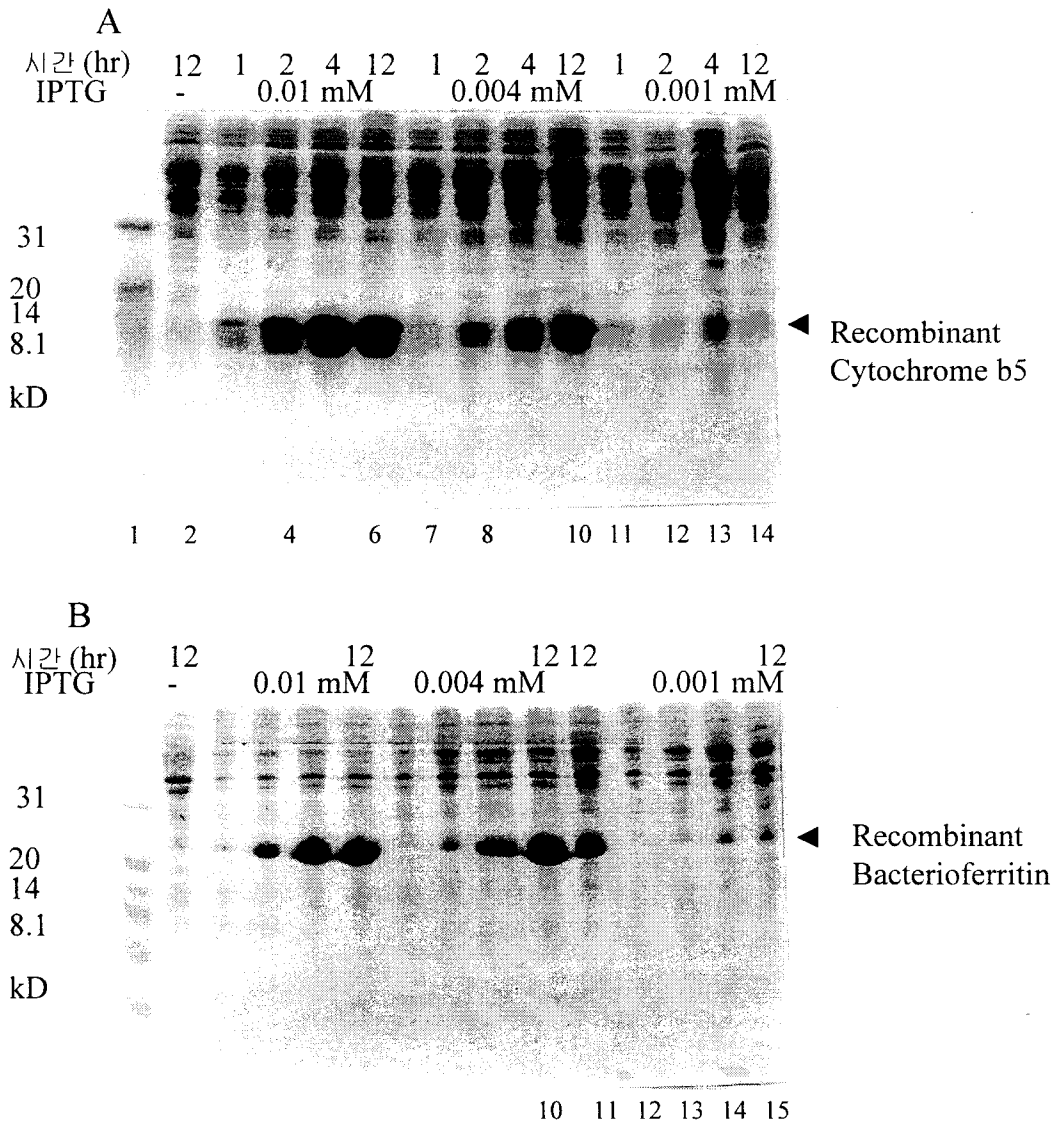


그림 3-4-4. IPTG 농도와 시간에 따른 재조합 단백질의 발현. (A) Cytochrome b5. Lane 1: no IPTG, lanes (2-5): 0.01 mM IPTG induction시간은 그림에서 보는바와 같이 1, 2, 4, 12 시간씩 발현 시켰다. Lanes (6-9): 0.004 mM IPTG, lanes (10-14): 0.001 mM IPTG, (B) bacterioferritin.(A)와 같으나 lane11은 0.002 mM IPTG induction에 의한 발현을 12 시간 후에 보여 주는 lane이다.

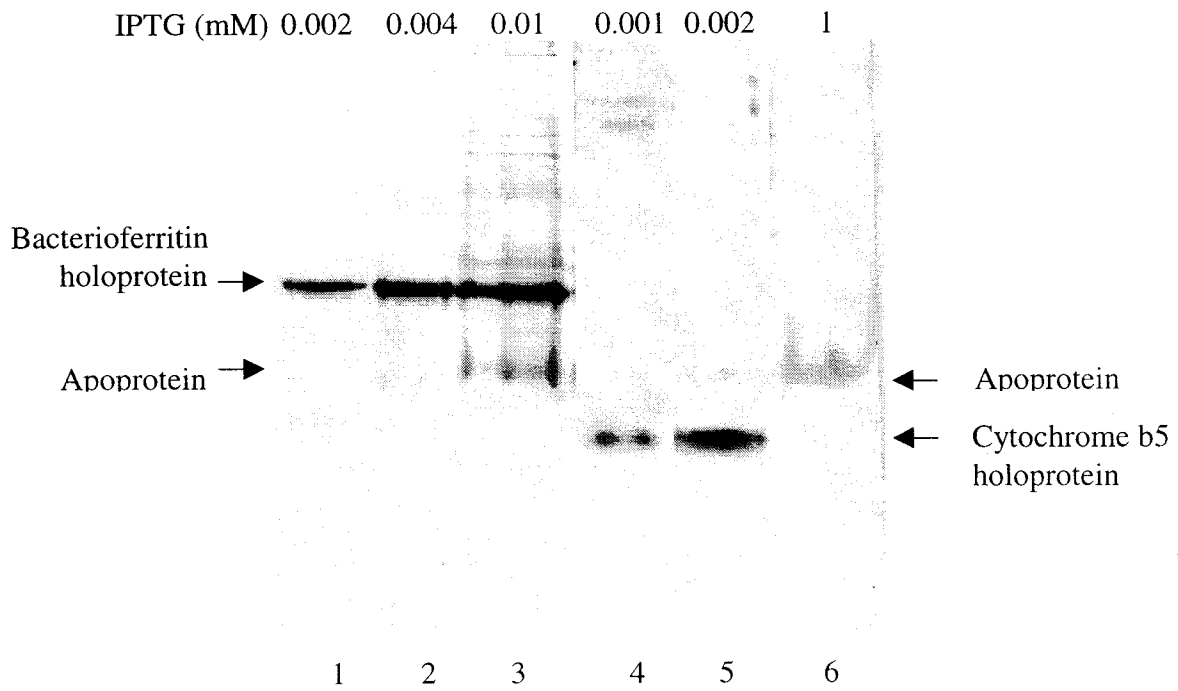


그림 3-4-5. 12% non-denature gel. Lanes (1-3): bacterioferritin의 재조합 단백질 합성에서 IPTG농도에 따라 apoprotein과 holoprotein사이의 비가 달라진다. Lanes (4-6): Cytochrome b5의 합성에서도 1 mM IPTG에 의한 다량 발현의 경우 거의 대부분의 재조합 단백질이 heme을 가지고 있지 않은 apoprotein의 형태를 하고 있다.

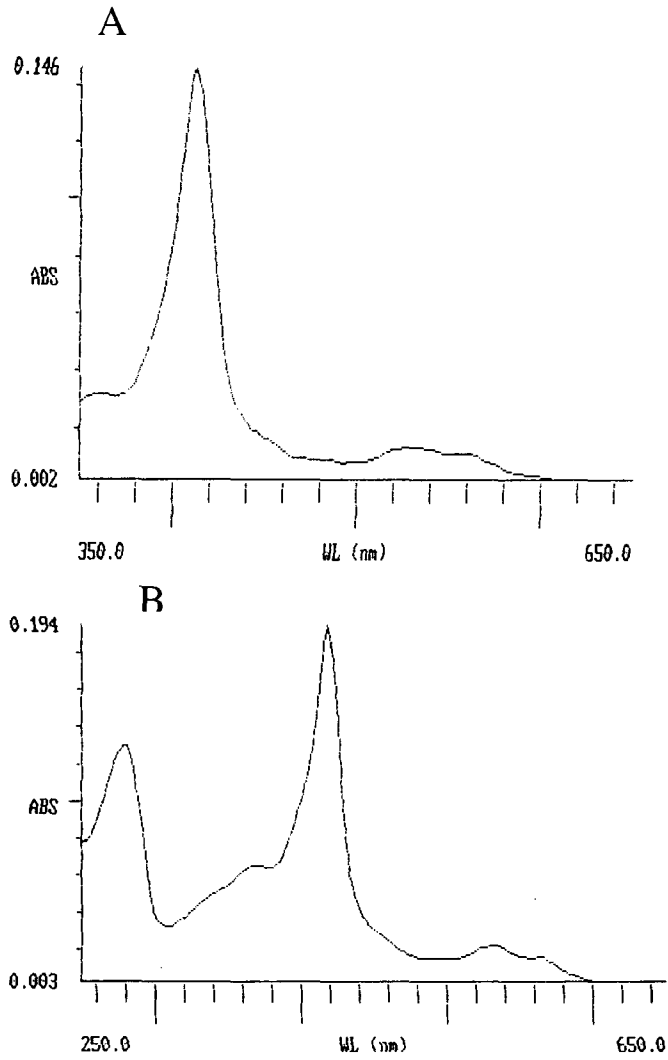


그림 3-4-6. UV-visible spectra. (A) Cytochrome b5 [350nm-650nm] (B) Bacterioferritin [250nm-650nm] : 1cm quartz cell을 사용하였고 8.8 mM phosphate buffer pH 7.0용액상에서 얻은 spectrum이다.

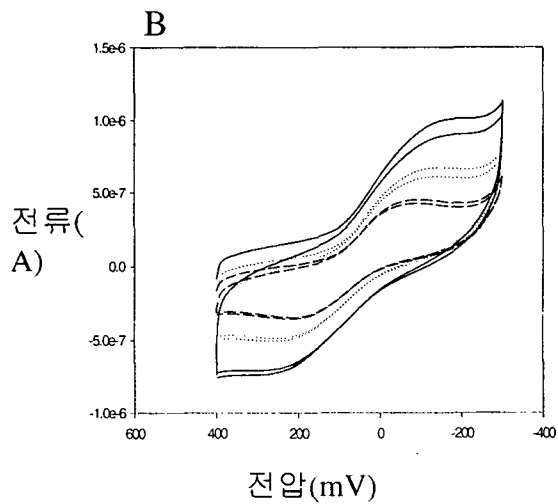
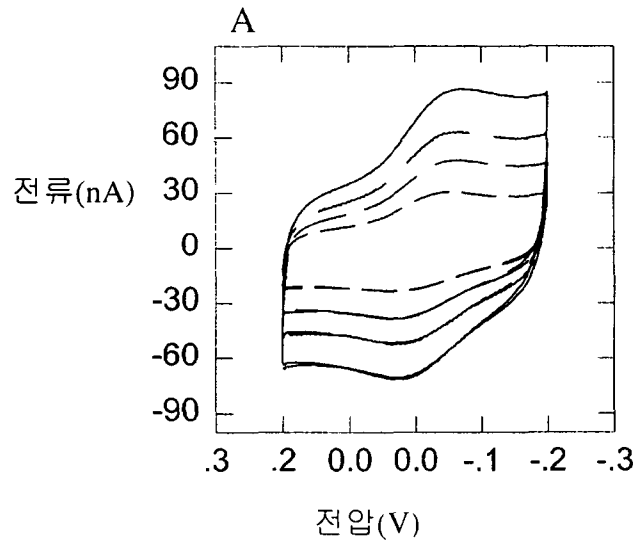


그림 3-4-7 . Cyclic voltammogram. (A) 6-mercaptohexanoic acid의 SAM이 layer를 형성하고 있는 금 전극 위에서의 cytochrome c의 CV. Scan rate: 30, 50, 70, 100mV/s. (B) Cystamine의 SAM이 layer를 형성하고 있는 금 전극 위에서의 cytochrome c의 CV. Sane rate: 25, 50, 100mV/s. 실험은 상온에서 실시 하였고, 10mM phosphate buffer pH7.0용액상에서의 CV이다.

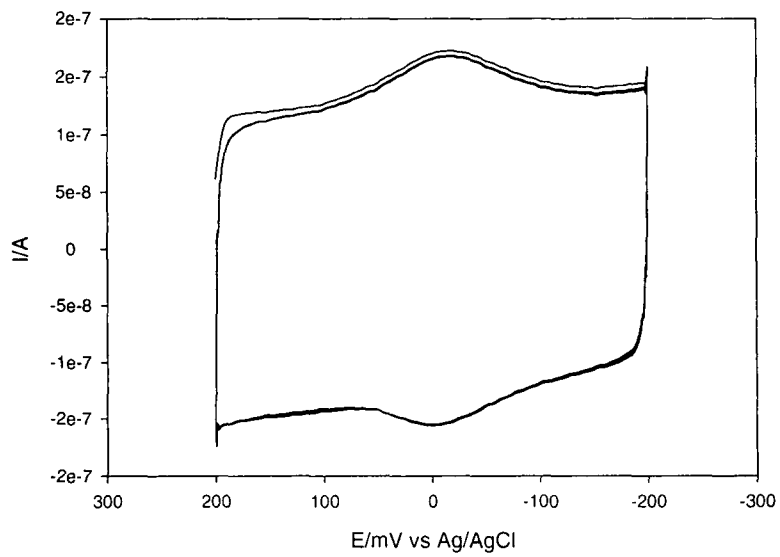


그림 3-4-8. Cyclic voltammogram for immobilized cytochrome c. EDC와 NHS를 이용하여 thiol의 carboxyl group에 cytochrome c를 결합시킨다. Scan rate: 100 mV/s 10 mM phosphate buffer pH 7.0

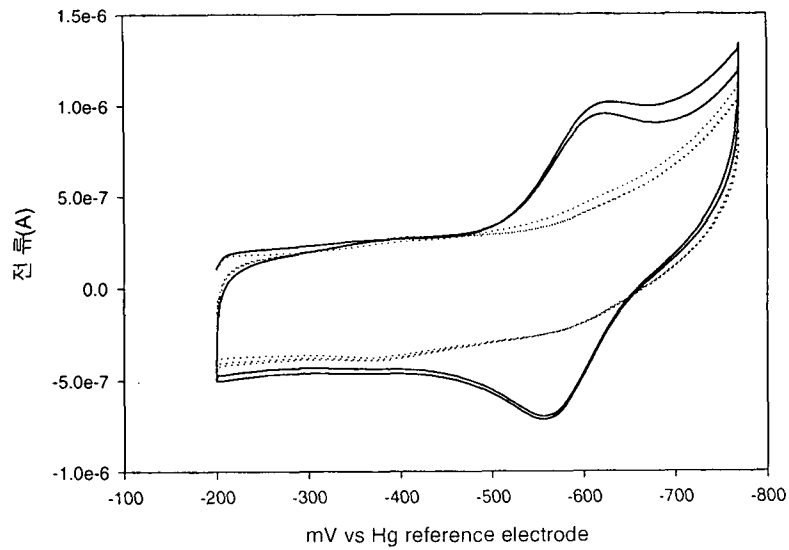


그림 3-4-9. Cytochrome b5의 cyclic voltammogram
 Cysteine의 SAM이 layer를 형성하고 있는 금 전극 위에
 cytochrome b5 100 uM이 있을 때와 양이온인 poly-L-lysine이
 가해 졌을 때의 CV. Scan rate: 100mV/s
 모든 CV실험은 같은 buffer하에서 이루어졌다.

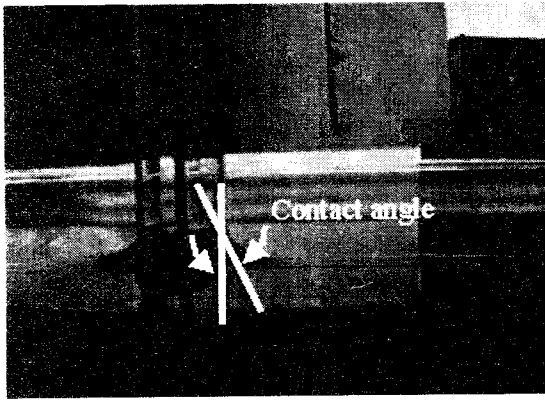


그림 3-5-1. Contact angle의 측정.

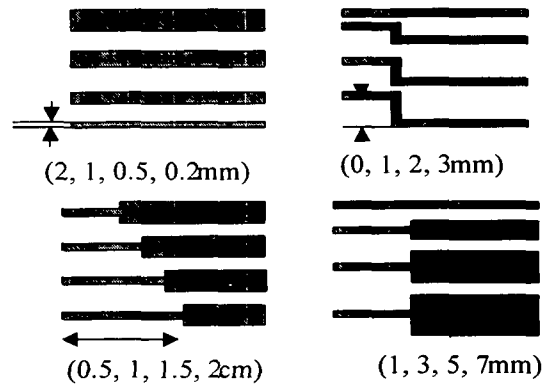


그림 3-5-2. 마이크로채널의 설계 및 제작.

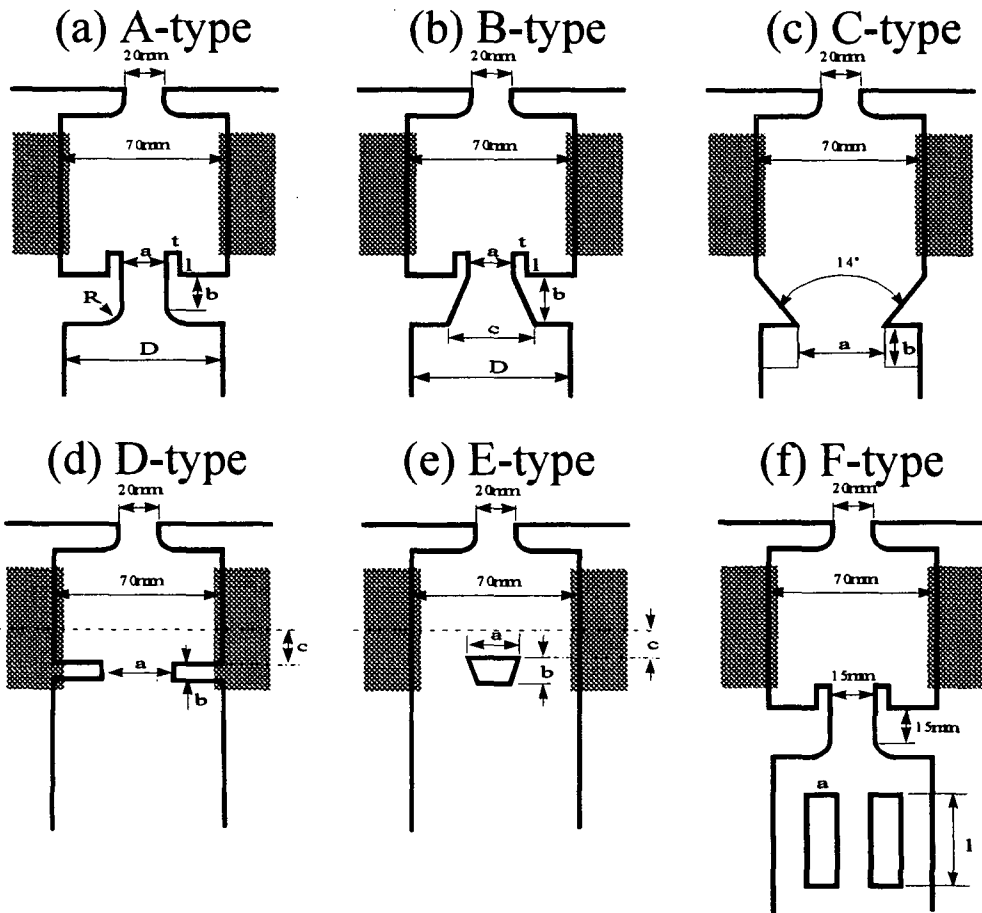
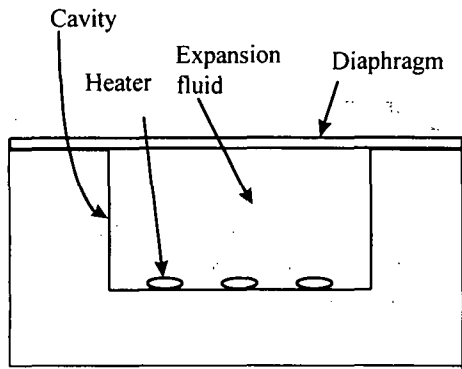
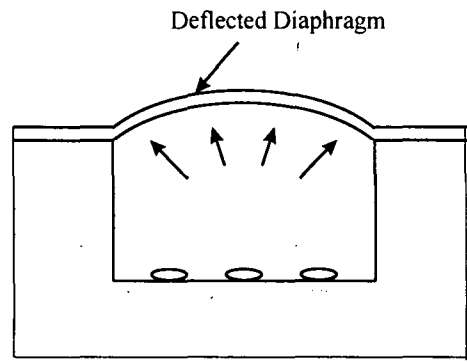


그림 3-5-3. 마이크로 디퓨저의 설계 및 제작.



(a) 전류를 가하기 전



(b) 전류를 가하고 난 후

그림 3-5-4. 열공압형 액추에이터의 작동 원리.

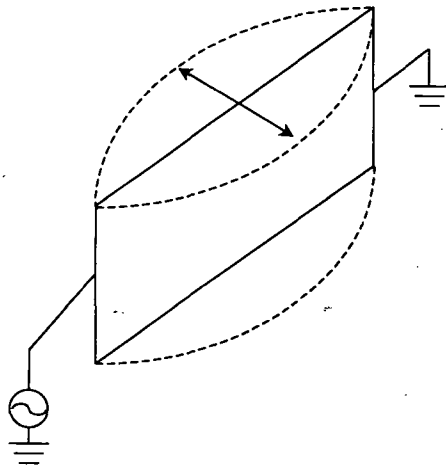


그림 3-5-5. 전자기구동 시험

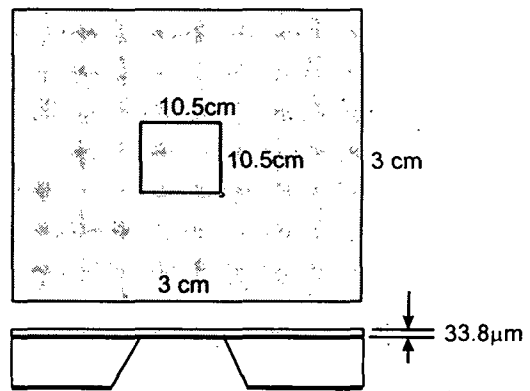


그림 3-5-6. 블리스터 시험용 시편의 설계 및 제작

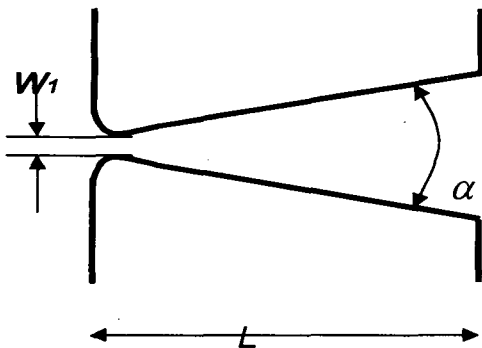


그림 3-5-7. 미소 diffuser의 개략도

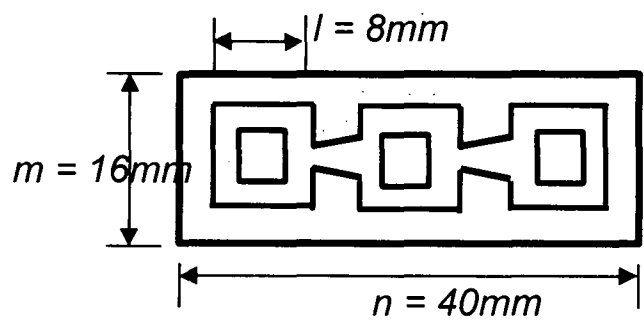
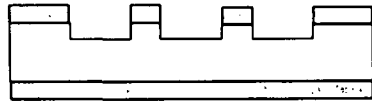
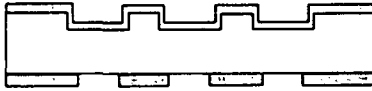


그림 3-5-8. 설계된 미소 diffuser



Oxidation(1.5 μm)
Lithography
RIE etching

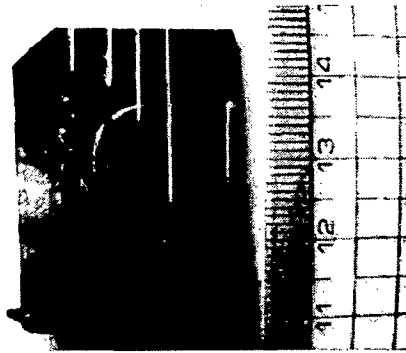


Silicon nitride deposition (2000 Å)
Back side lithography
Back side RIE etching

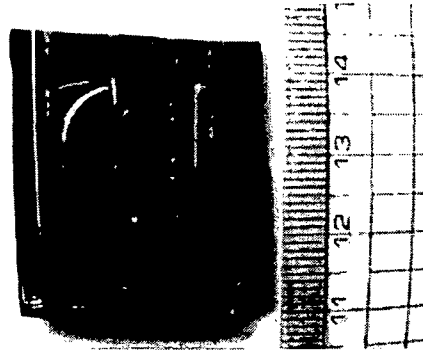


Back side etching(KOH)
Silicon nitride removal

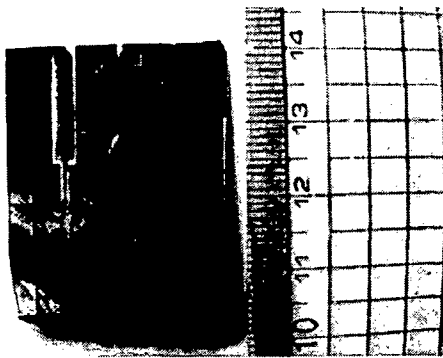
그림 3-5-9. 미소 diffuser의 제작 공정



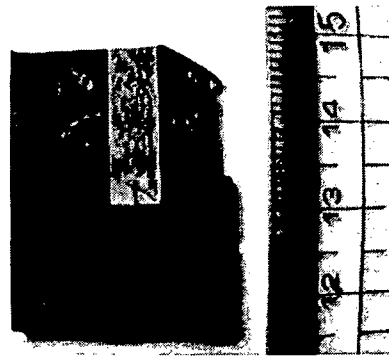
(a)



(b)



(c)



(d)

그림 3-5-10. (a) 채널 폭을 달리한 모세관 현상실험; (b) 곡관 길이변화에 따른 모세관 현상실험; (c) 입구 길이를 달리한 모세관 현상실험; (d) 단면적 변화를 달리한 모세관 현상실험.

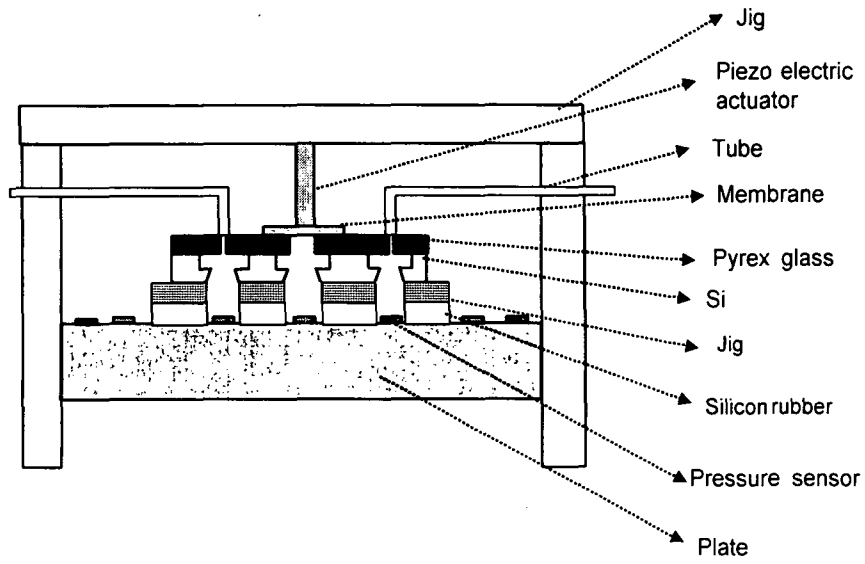


그림 3-5-11. 밀봉 접합된 미소 diffuser

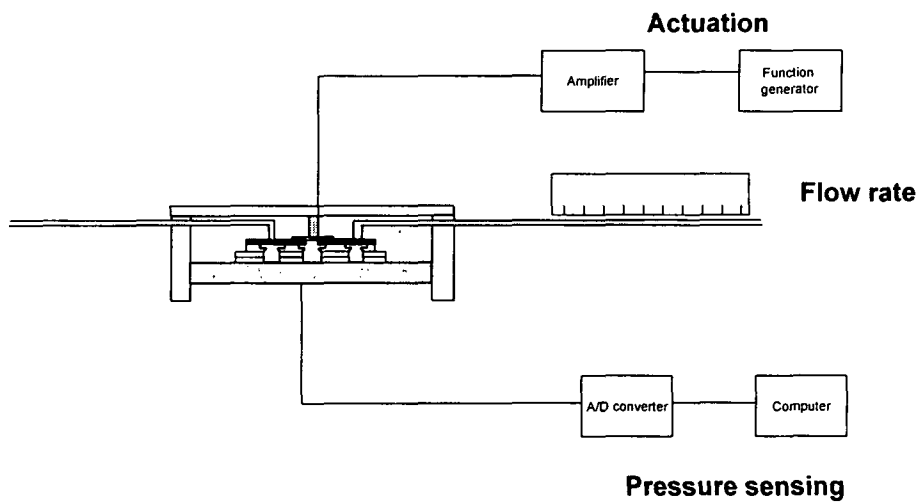


그림 3-5-12. 미소 diffuser의 성능 측정 장치의 구성도

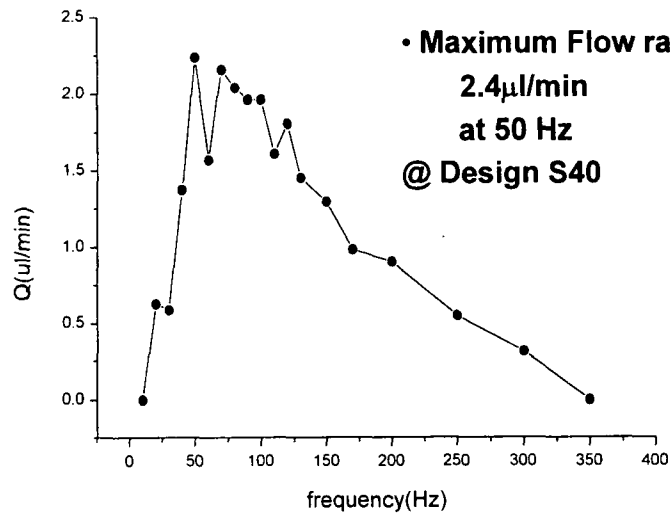
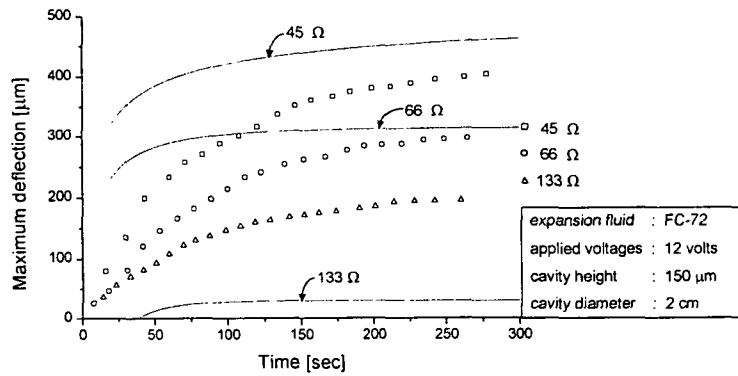
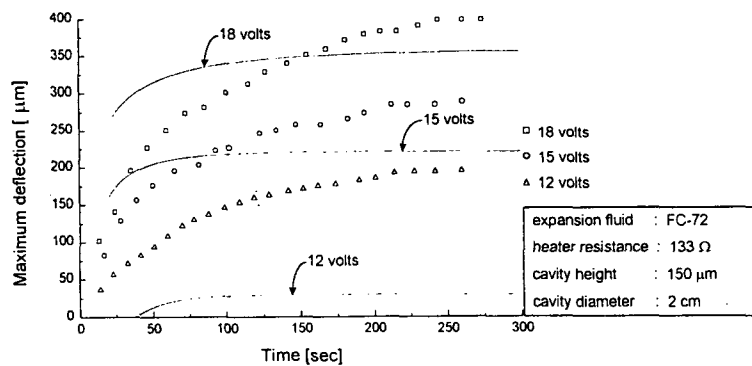


그림 3-5-13. 측정된 유동 특성



(a) 탄탈륨 히터 저항의 변화에 따른 열공압형 액추에이터의 구동성능 실험



(b) 입력 전압의 변화에 따른 열공압형 액추에이터의 구동성능 실험

그림 3-5-14. 조건 변화에 따른 열공압형 액추에이터의 성능 실험.

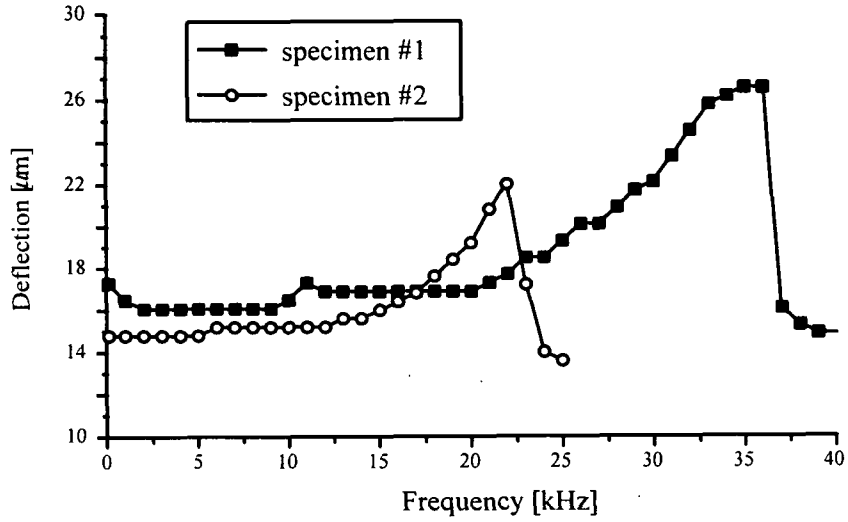


그림 3-5-15. 공기 중에서 주파수변화에 따른 미소빔의 변형량 시험결과.

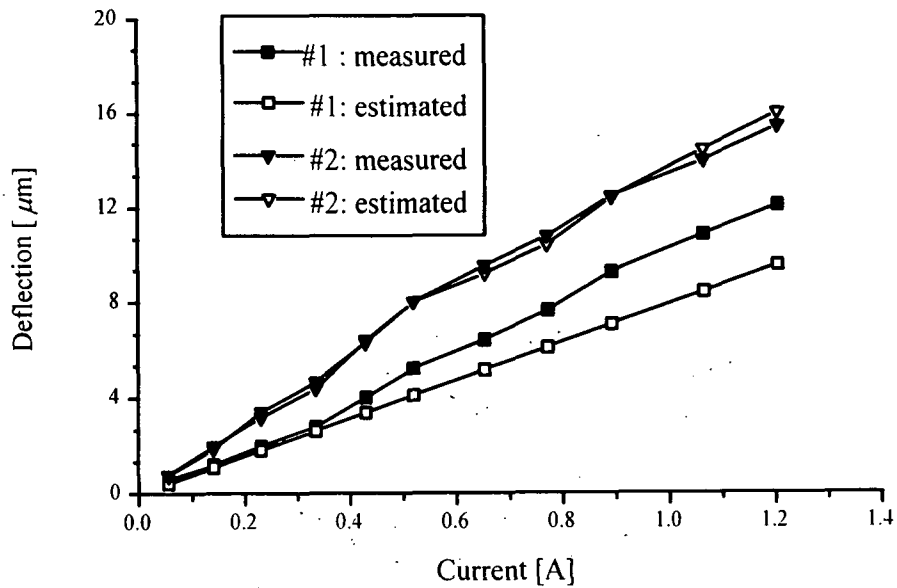


그림 3-5-16. 물 속에서 미소빔의 전류변화에 따른 정적 변형량 시험결과

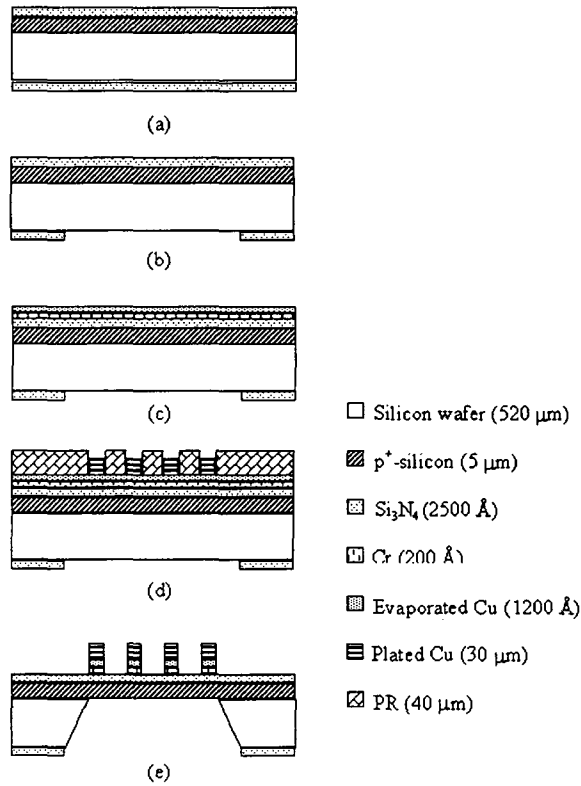


그림 3-5-17. Fabrication process for the electroplated planar coil on the diaphragm: (a) boron doping and Si₃N₄ deposition; (b) RIE of Si₃N₄ for etch window opening; (c) Cr/Cu seed layer evaporation; (d) thick PR patterning and Cu plating; (e) Cr/Cu seed layer etching and backside silicon etching.

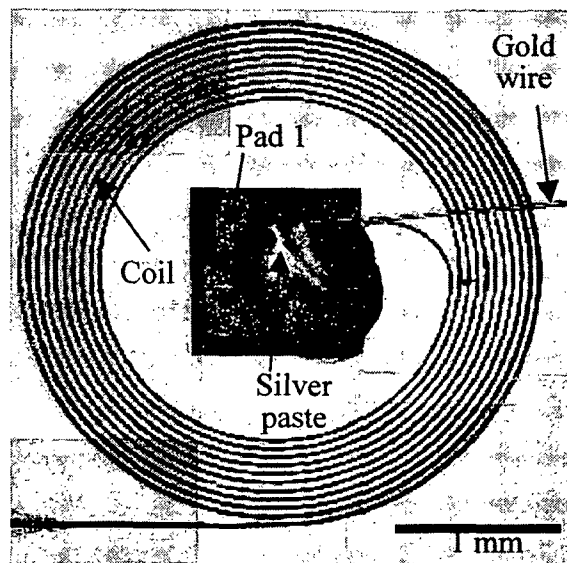
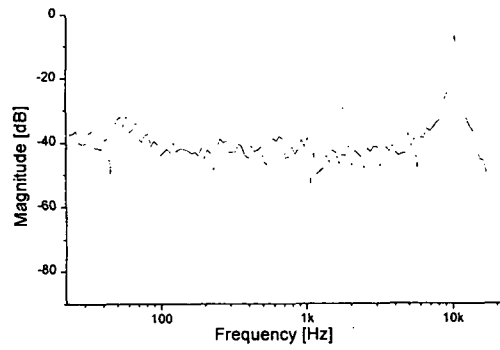
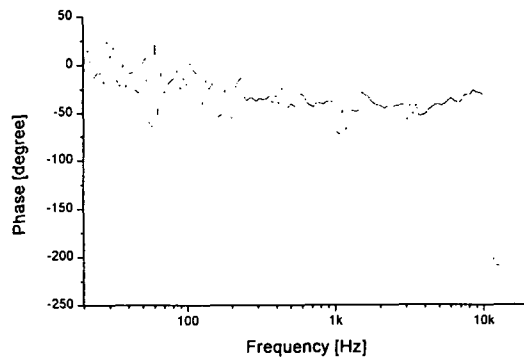


그림 3-5-18. Top view of the fabricated microactuator, where the gold wire provides an electrical interconnection.



(a)



(b)

그림 3-5-19. Frequency response function of the electromagnetic actuator: (a) amplitude response; (b) phase response.

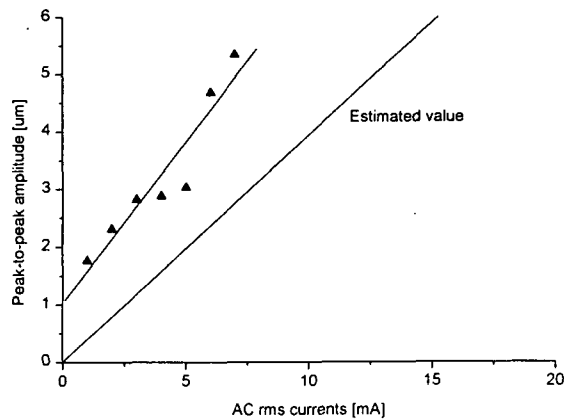


그림 3-5-20. Measured and estimated peak-to-peak amplitude of the microactuator for varying AC coil current at the resonant frequency of 10.6kHz for the case of the single magnet (S0).

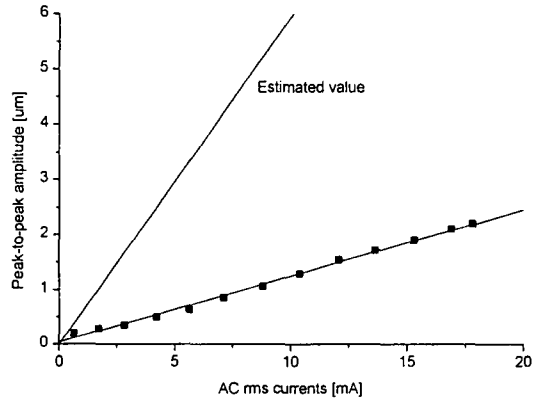


그림 3-5-21. Measured peak-to-peak amplitude of the microactuator for the varying AC coil currents at the resonant frequency of 10.6kHz for the case of the twin magnets with single hole (T1).

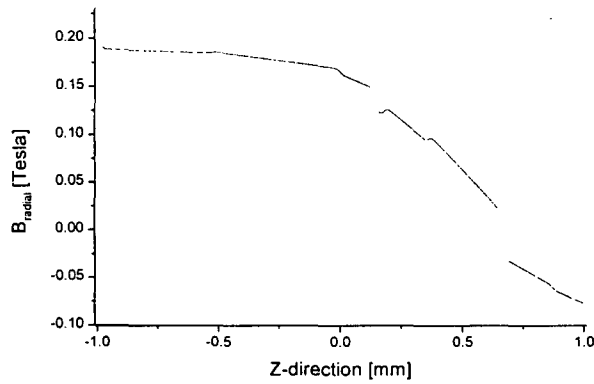


그림 3-5-22. Estimated magnitude of the radial magnetic field along z-direction for the case of the twin magnets with single hole.

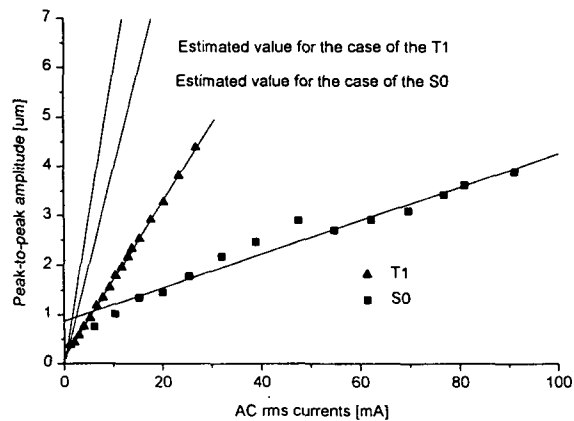


그림 3-5-23. Measured and estimated peak-to-peak amplitude of the microactuator for varying AC coil currents at the resonant frequency of 10.51 kHz.

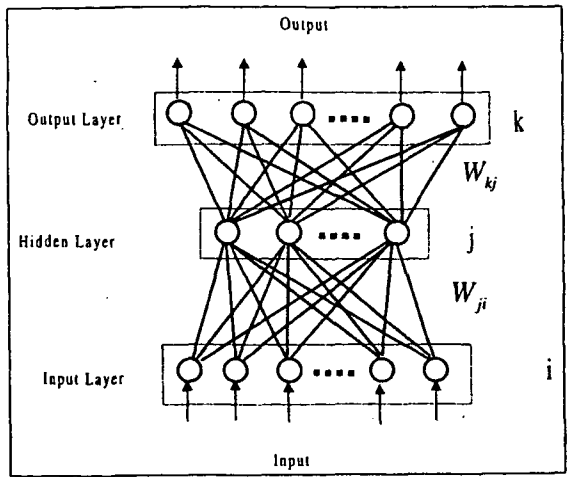


그림 3-6-1 다층퍼셉트론 신경회로망의 구조

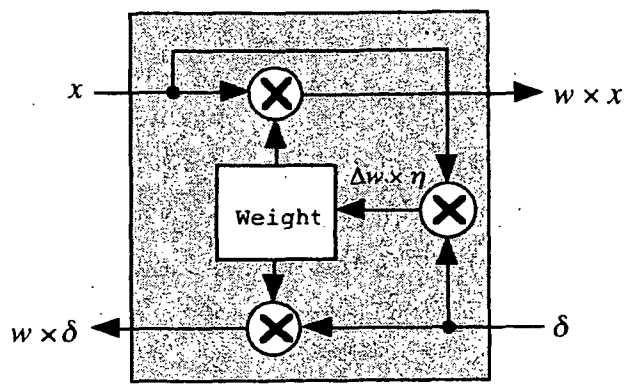


그림 3-6-2 시냅스 셀(Synapse Cell)

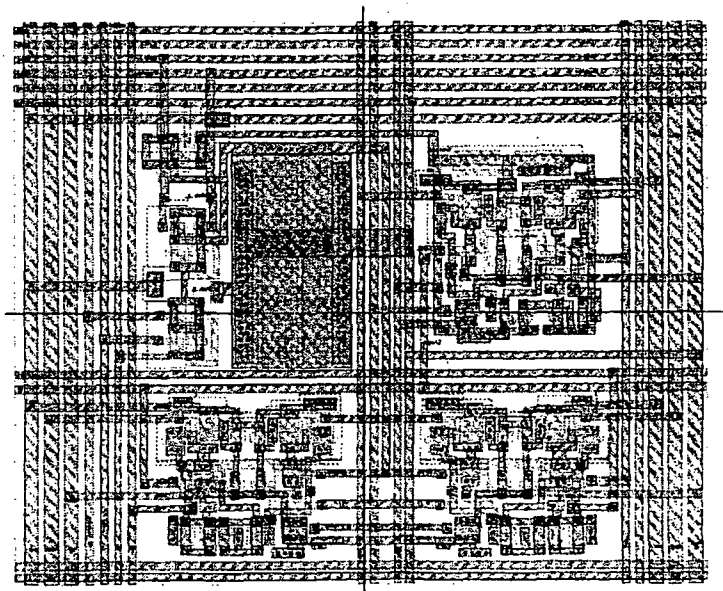


그림 3-6-3 시냅스셀의 layout

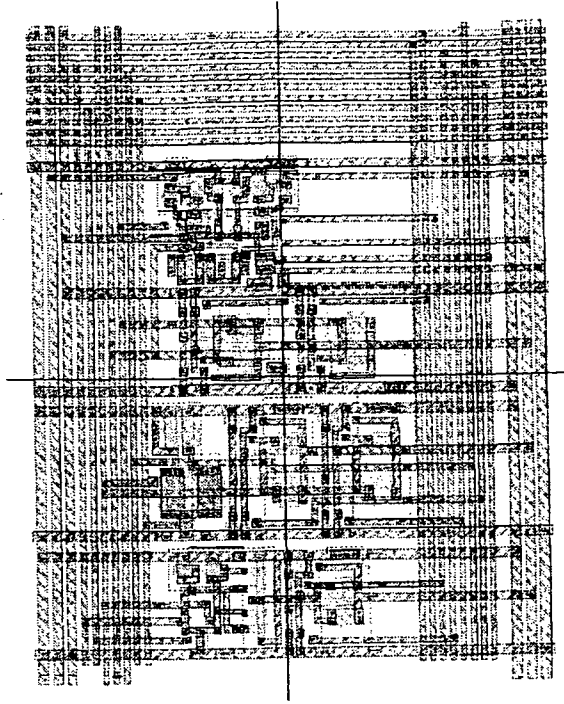


그림 3-6-7 뉴런셀의 layout

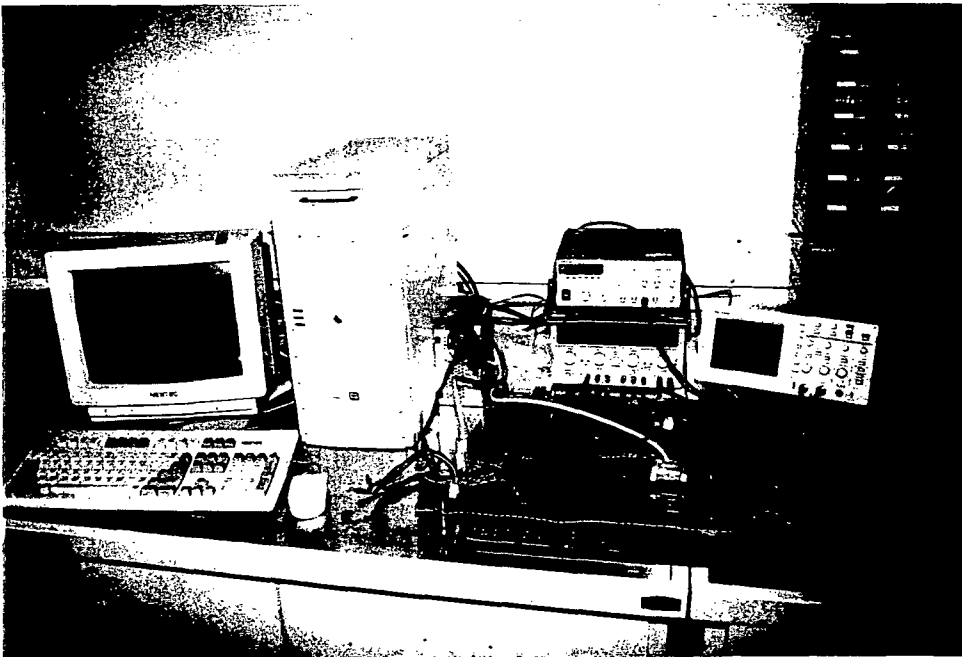
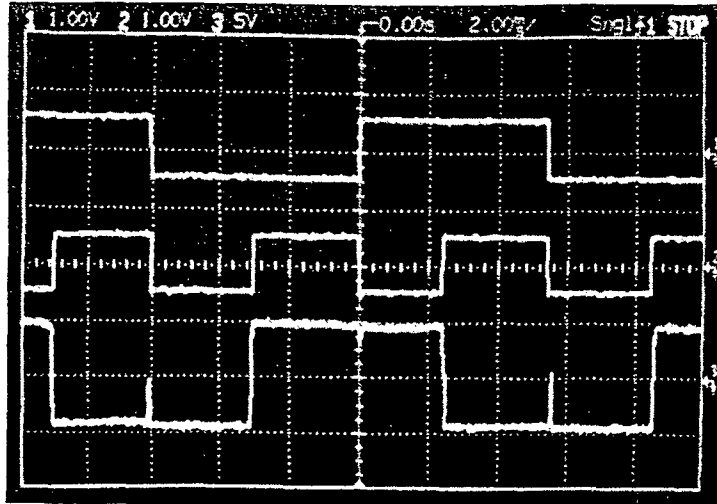


그림 3-6-8 신경회로망 보드의 사진



(1st : Input1, 2nd : Input2, 3rd : Output)

그림 3-6-9 XOR문제의 출력 파형

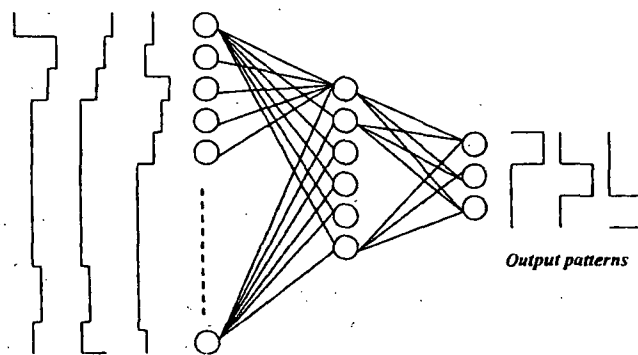


그림 3-6-10 wine문제에 사용된 신경회로망의 구조

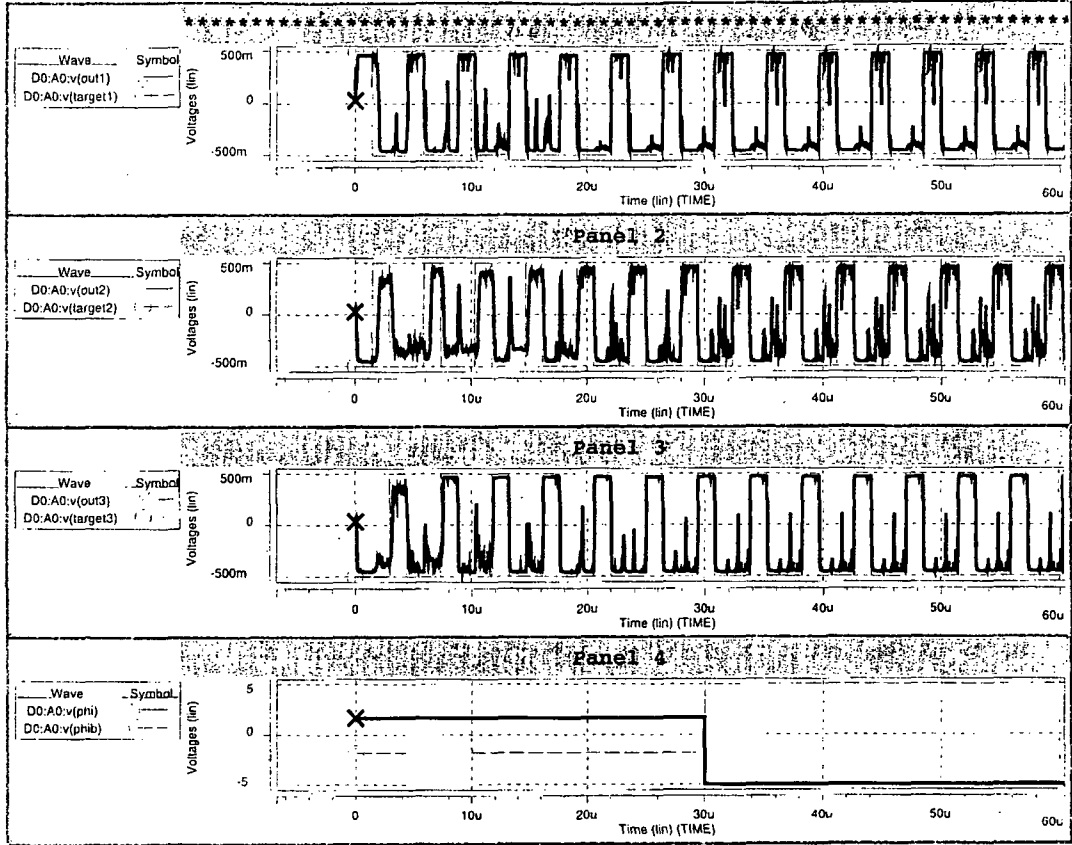


그림 3-6-11 Wine문제의 Hspice 시뮬레이션 결과

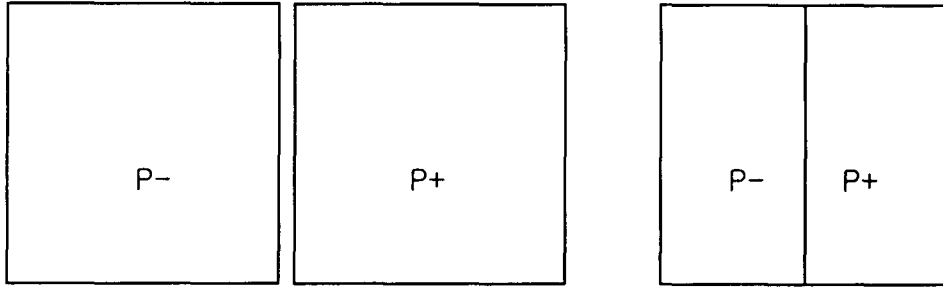


그림3-7-1. 다공질화 되는 속도 비교 실험

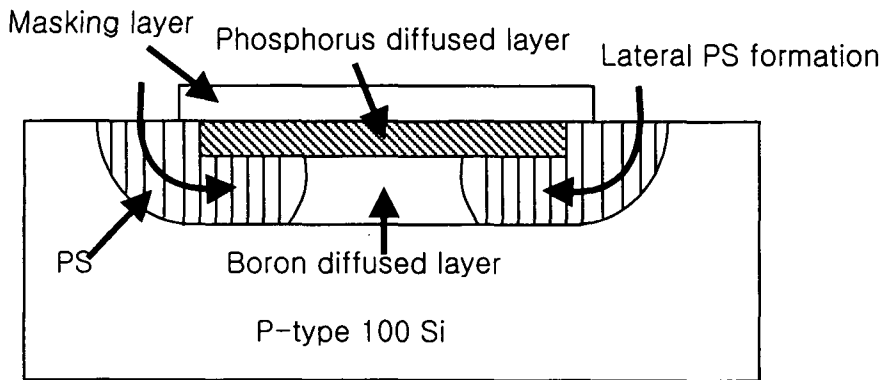


그림3-7-2. 웨이퍼 수평 방향의 다공질화

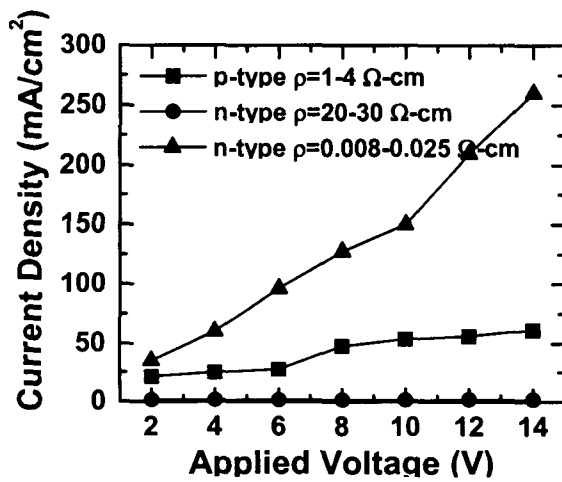


그림3-7-3. 다공질화 공정시 불순물 종류 및 농도에 따른 전압과 전류 밀도의 관계

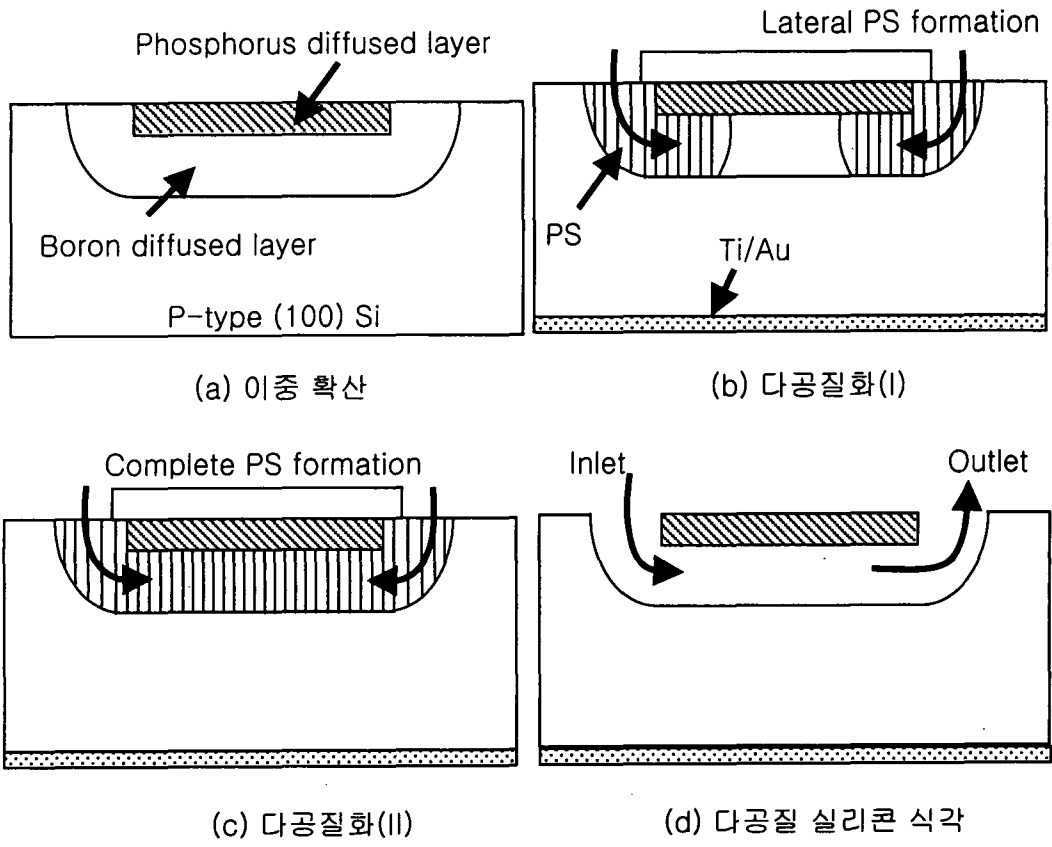


그림 3-7-4. 미소 채널 제작을 위한 공정도

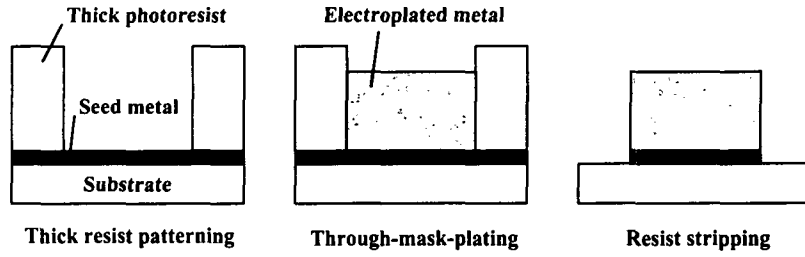


그림 3-7-5. Through-Mask-Plating Technology

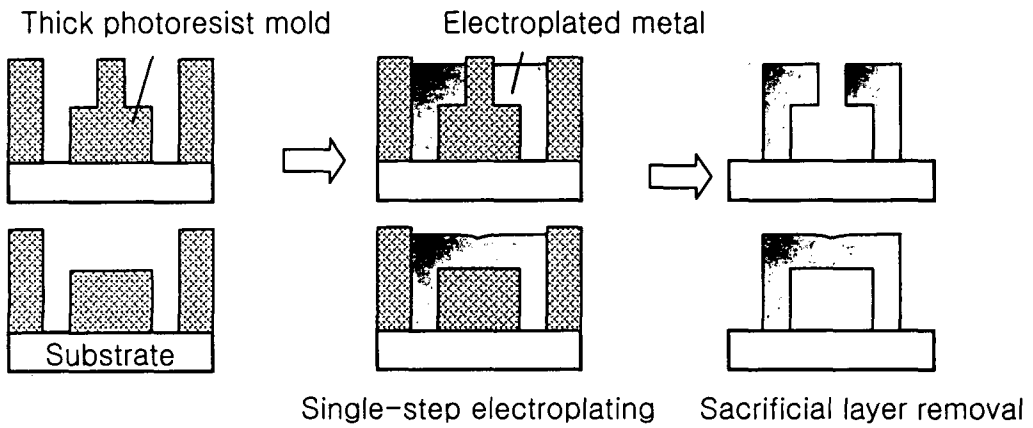


그림 3-7-6. 두꺼운 감광막과 전기도금을 이용한 채널 형성 방법

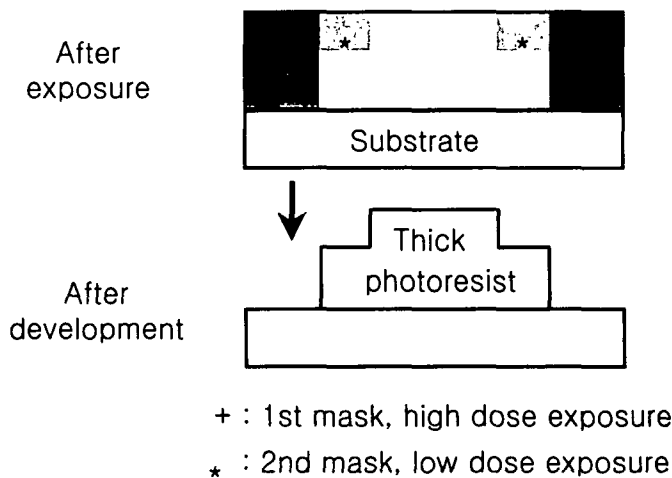


그림 3-7-7. MESD 방법을 이용한 두꺼운 감광막 mold 형성법

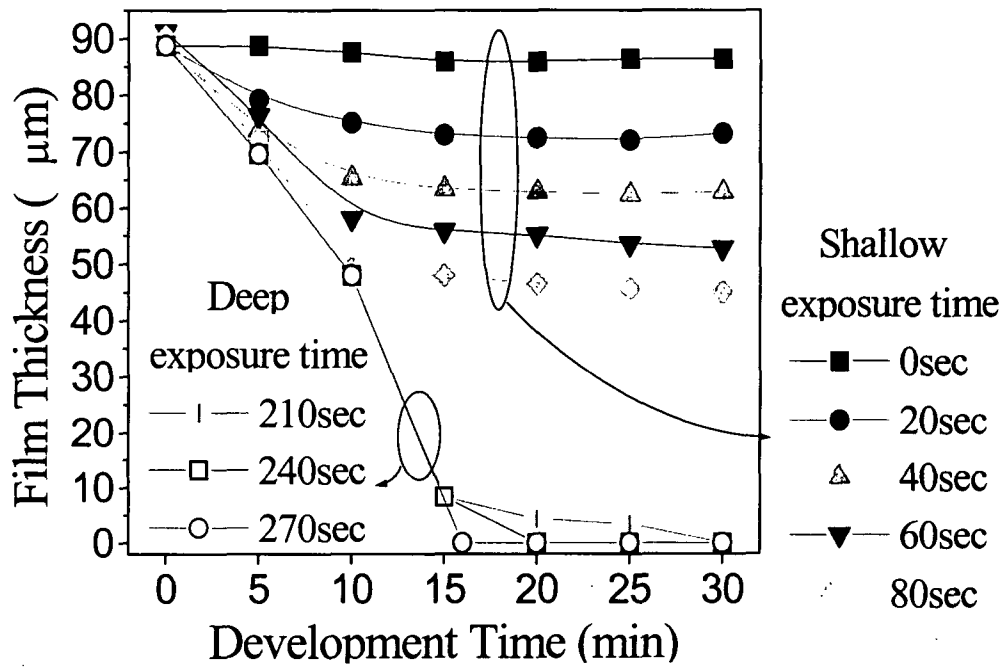


그림 3-7-8. 90 μm 두께 감광막(AZ9262)에서의 노광 시간에 따른 development 특성

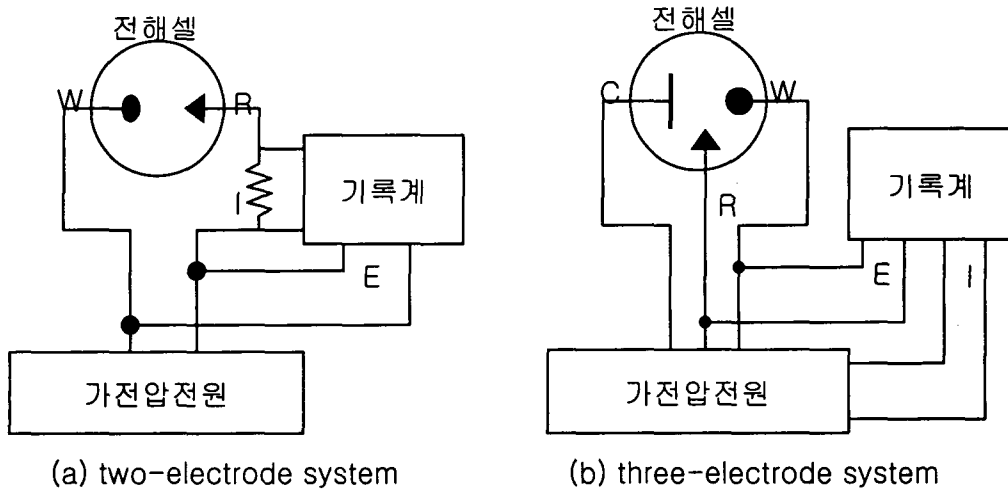


그림 3-7-9. 전극계의 구성

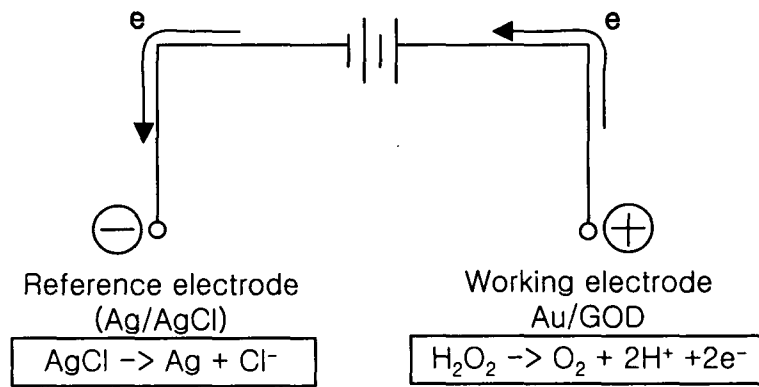


그림 3-7-10. 기준 전극과 작업 전극에서의 전기화학 반응

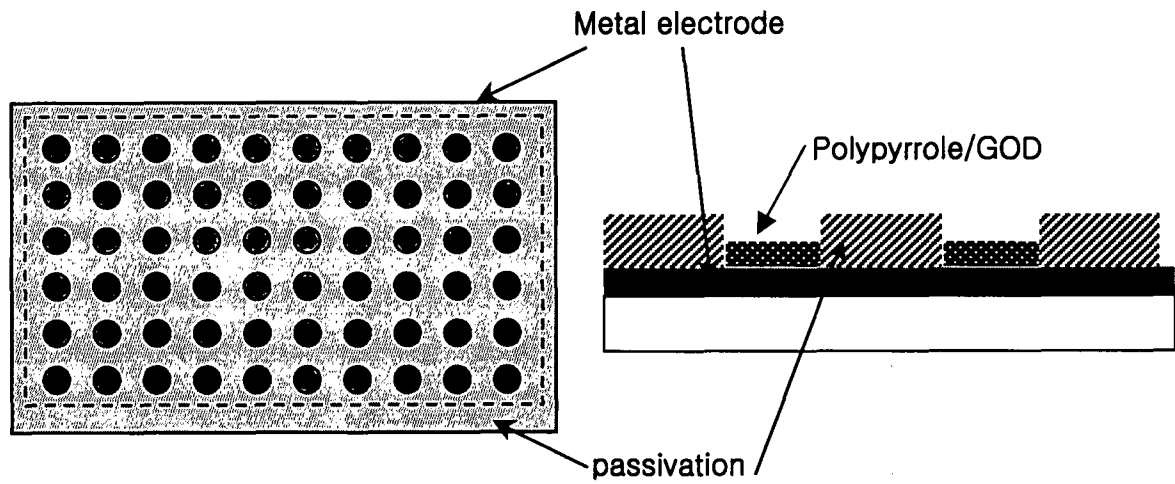


그림 3-7-11. 미세 전극 배열 구조

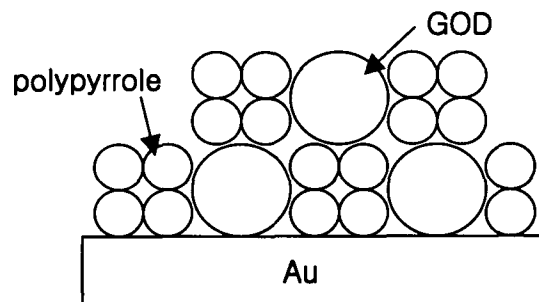


그림 3-7-12. Electropolymerization에 의해 GOD를 포함한 polypyrrole이 gold 전극 위에 형성된 모습

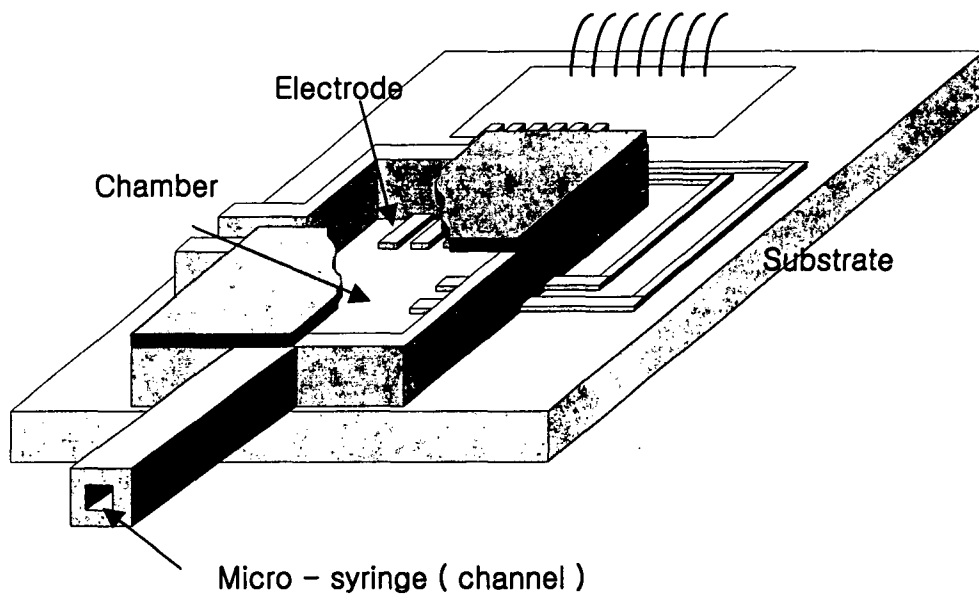
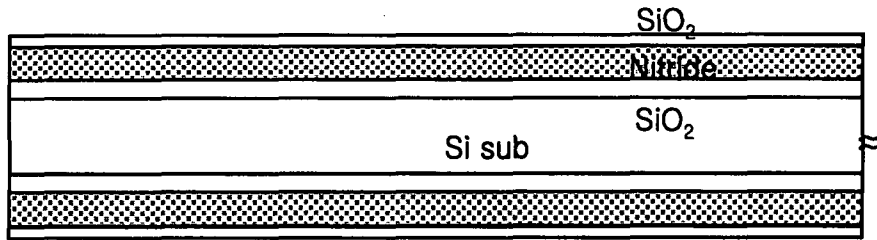
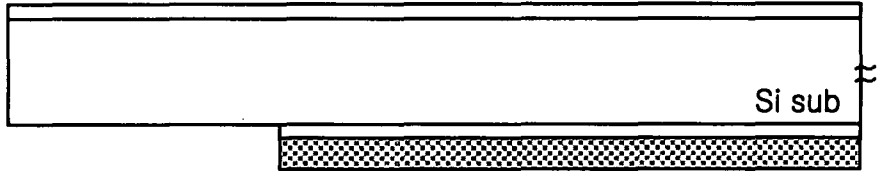


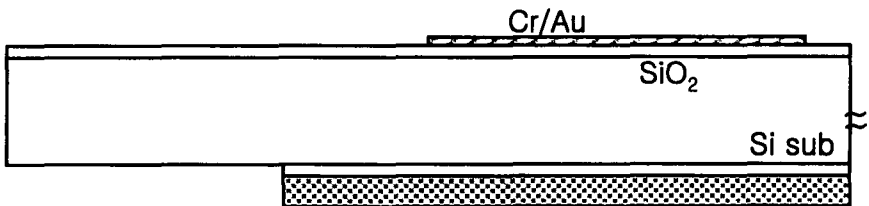
그림 3-7-13. 마이크로 바이오 센서의 개념도



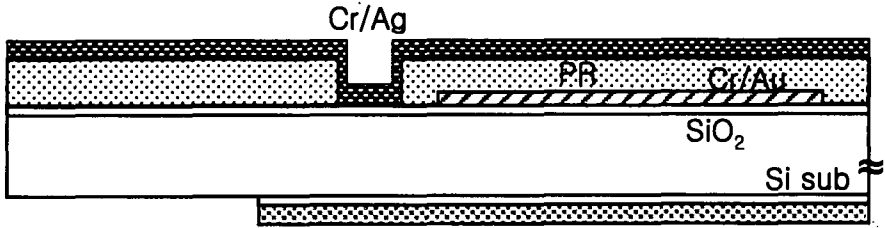
(a) buffer oxidation, nitride deposition & nitride oxidation



(b) back side etching 을 위한 nitride masking layer patterning

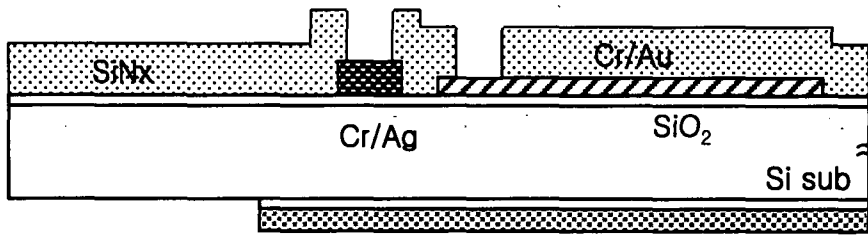


(c) gold layer evaporation & patterning

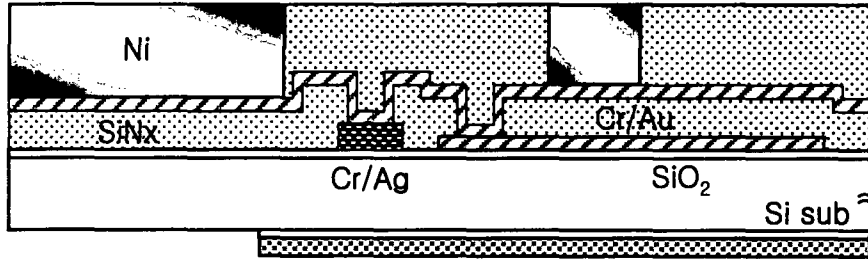


(d) silver electrode 를 위한 lift-off

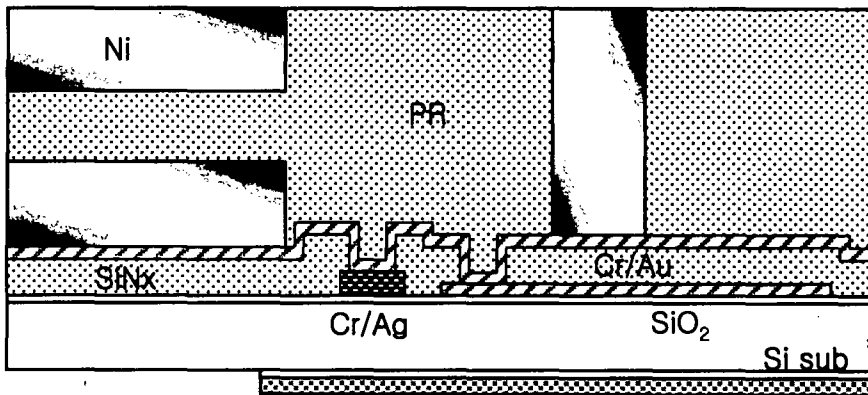
그림 3-7-14. 미세 전극과 구조체 집적화 공정도



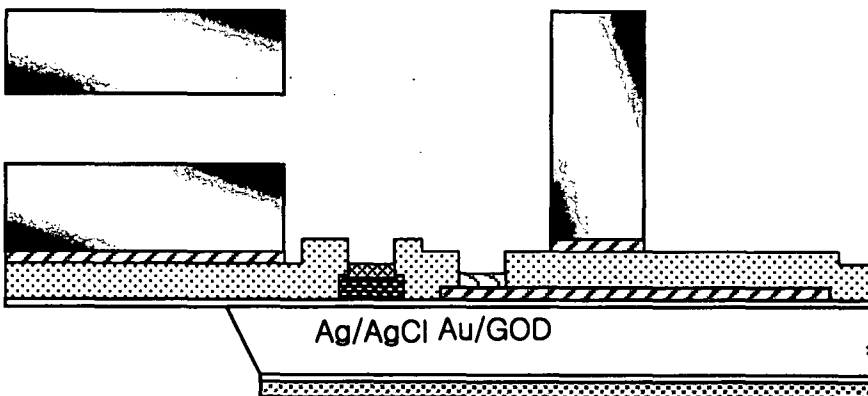
(e) SiNx deposition & patterning



(f) bottom metal plating

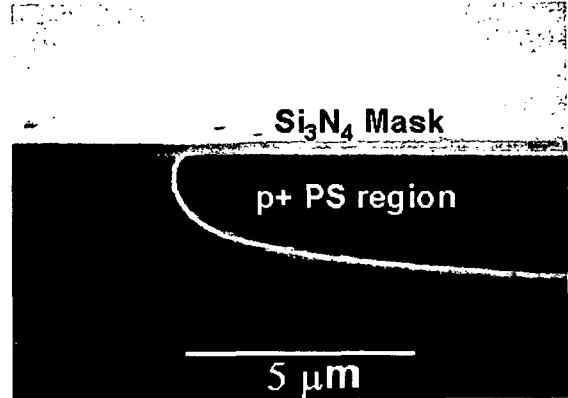
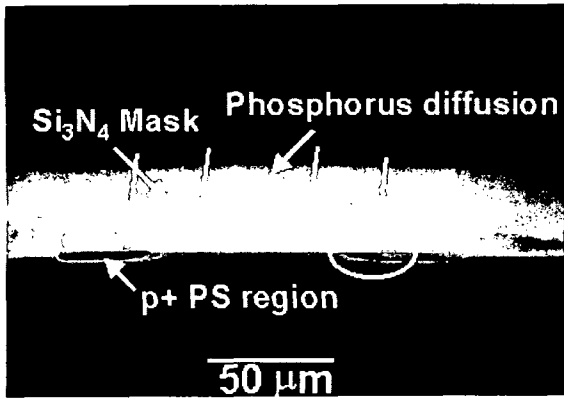


(g) top metal plating

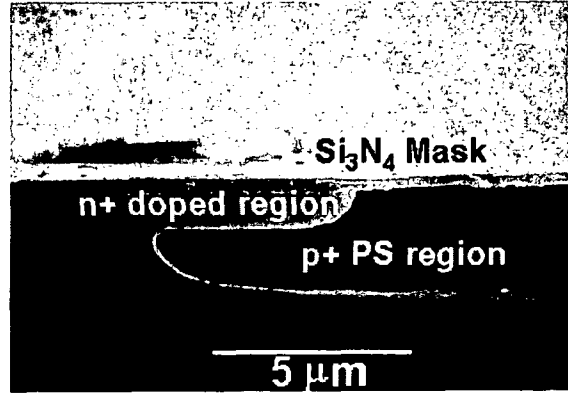
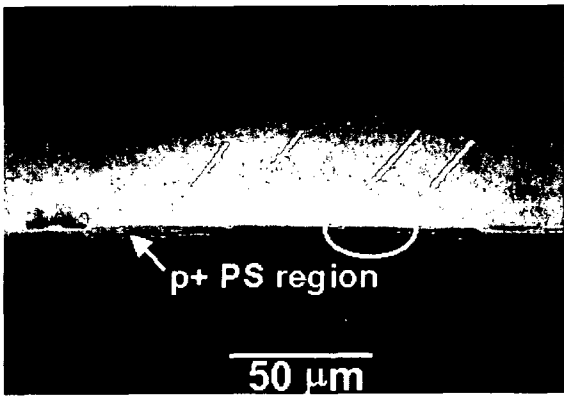


(h) back side etching, AgCl formation & electropolymerization

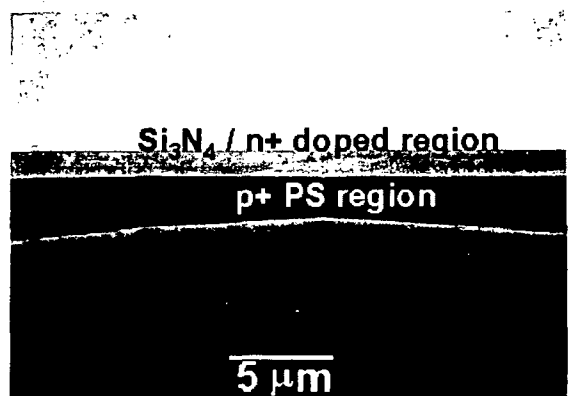
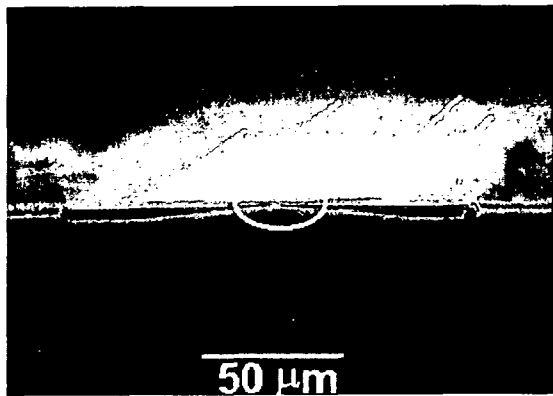
그림 3-7-14. 미세전극과 구조체 집적화 공정도(계속)



(a) 5분 후



(b) 15분 후



(c) 25분 후

그림 3-7-15. 다공질 실리콘 방법으로 제작된 모노리딕 마이크로 채널의 단면 SEM 사진

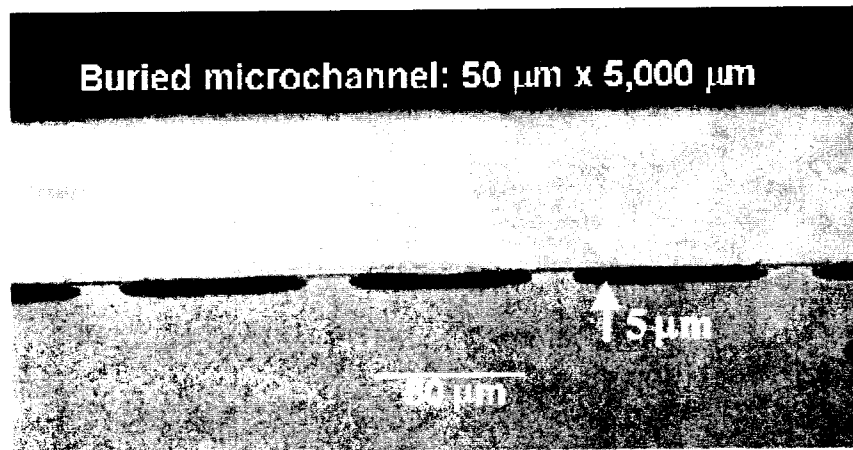
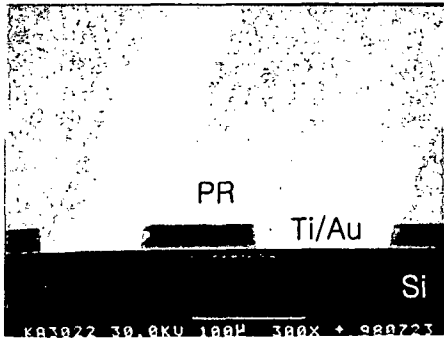
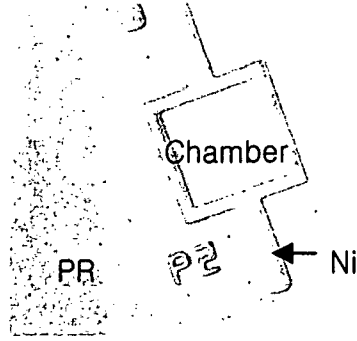


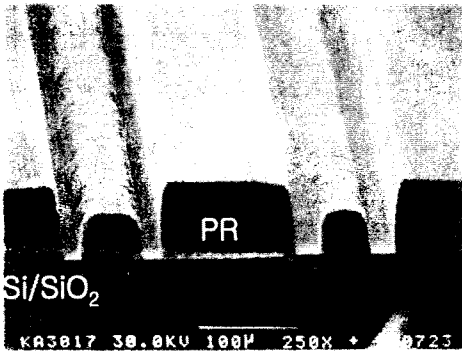
그림 3-7-16. 다공질 실리콘 방법으로 제작된 모노리딕 마이크로 채널의 단면 SEM 사진



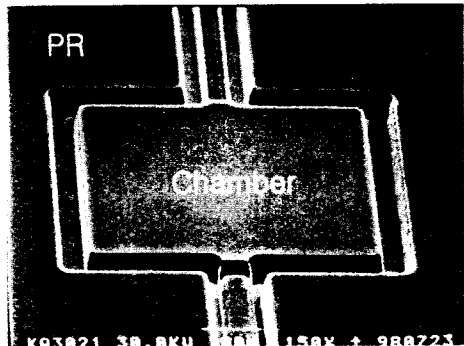
(a) 마이크로 채널용 PR mold SEM 사진



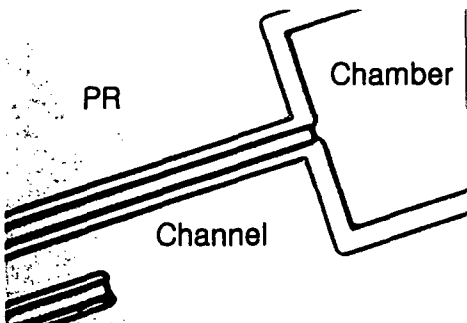
(b) 도금 후 현미경 사진



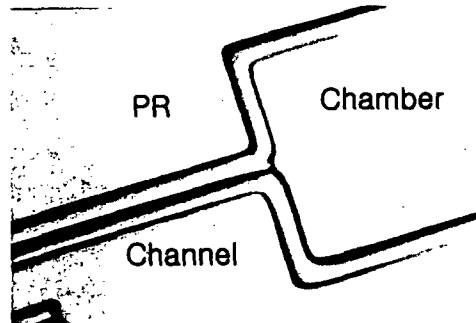
(c) 마이크로 채널용 thick PR mold SEM 사진(채널 부분)



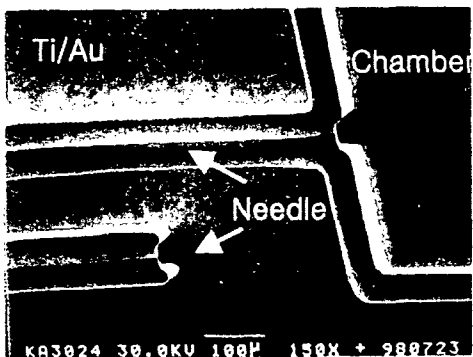
(d) 마이크로 채널용 thick PR mold SEM 사진(챔버 부분)



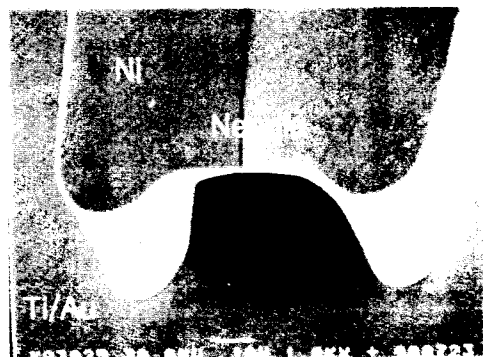
(e) 마이크로 채널 도금 공정중의 현미경 사진 (30min 경과)



(f) 마이크로 채널 도금 공정후의 현미경 사진 (90min 경과)



(g) 제작된 마이크로 채널의 SEM 사진



(h) 제작된 마이크로 채널의 SEM 사진

그림 3-7-17. MESD를 이용한 마이크로 채널 형성 과정

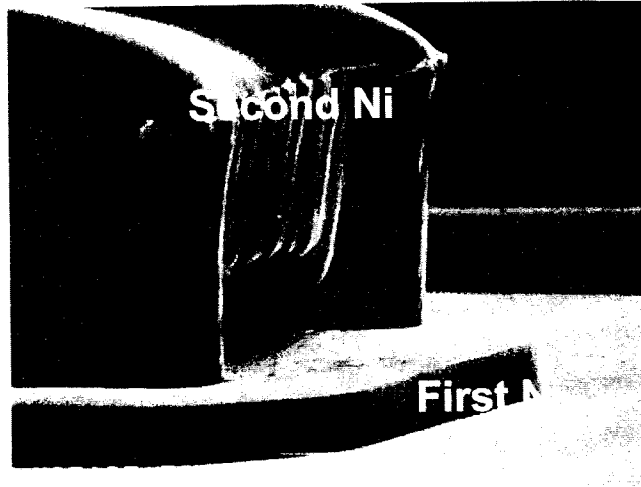
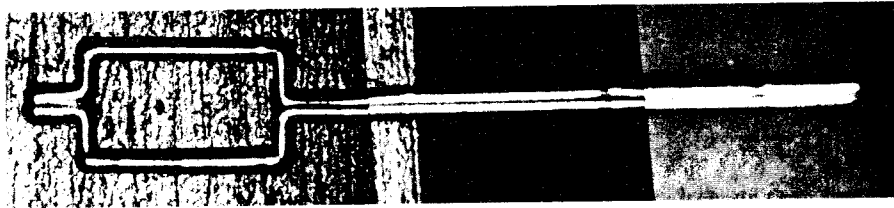
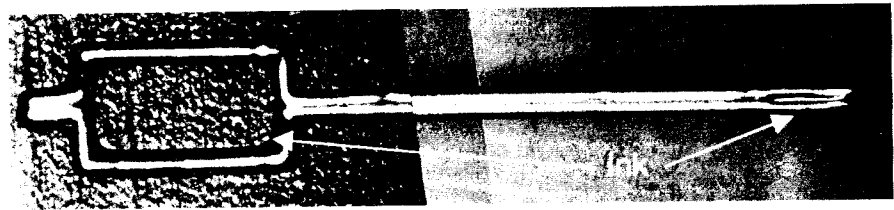


그림 3-7-18. 제작된 마이크로 채널의 SEM 사진



(a) Before test



(b) After test

그림 3-7-19. 제작된 마이크로 채널의 모세관 현상 실험 사진

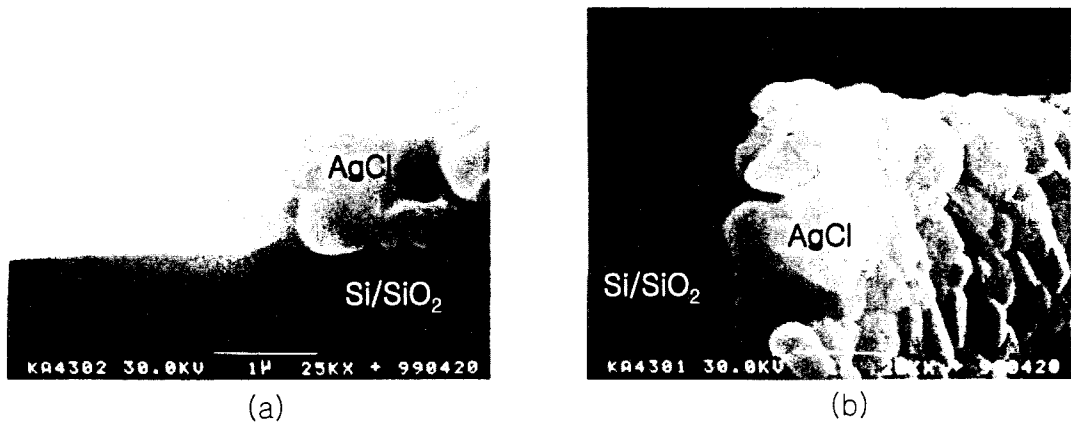


그림 3-7-20. Silver 전극이 0.025M의 FeCl₃ 수용액 내에서 10 분 동안 반응 후 AgCl가 생성된 단면 SEM 사진

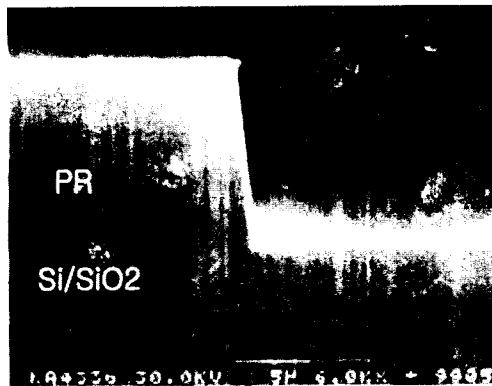
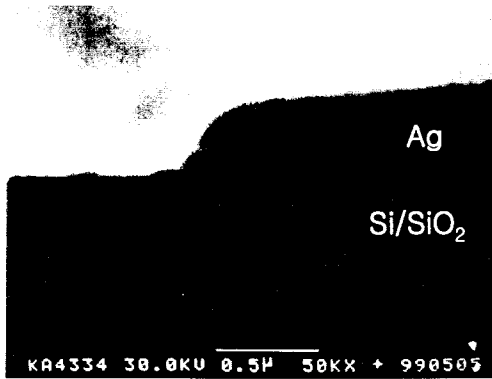
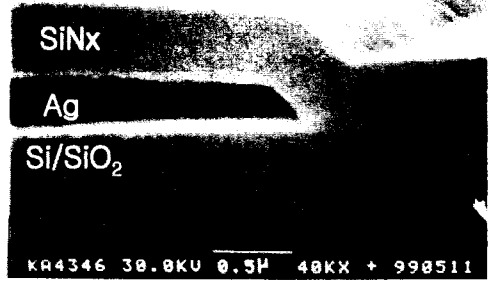


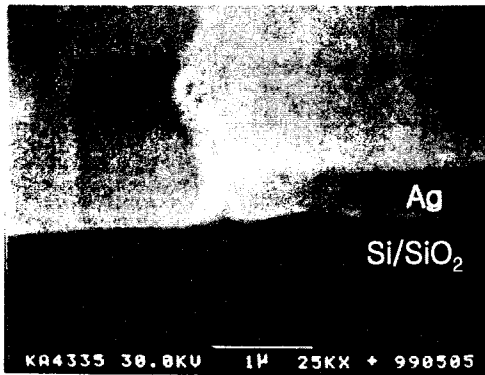
그림 3-7-21. Silver lift-off를 위한 PR 패턴의 SEM 사진



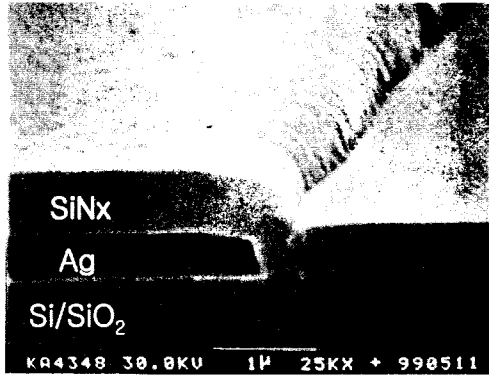
(a)



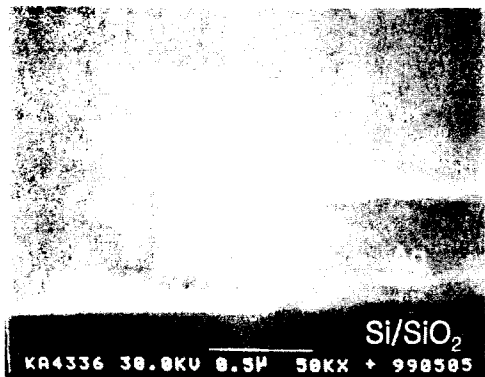
(b)



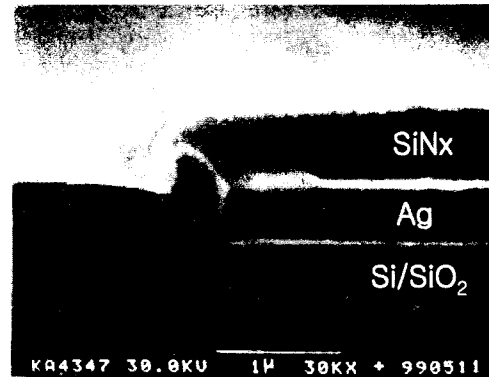
(c)



(d)



(e)



(f)

그림 3-7-22. Lift-off 공정후의 silver 패턴((a),(c),(e))과 그 위에 passivation을 위한 실리콘 질화막을 증착한 후((b),(d),(f))의 단면 SEM 사진

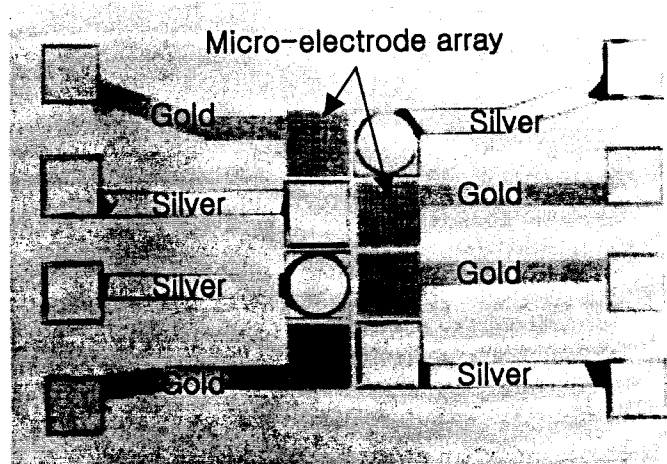
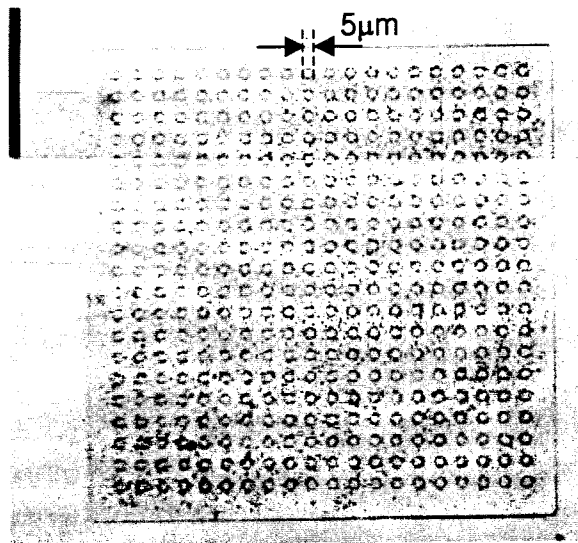
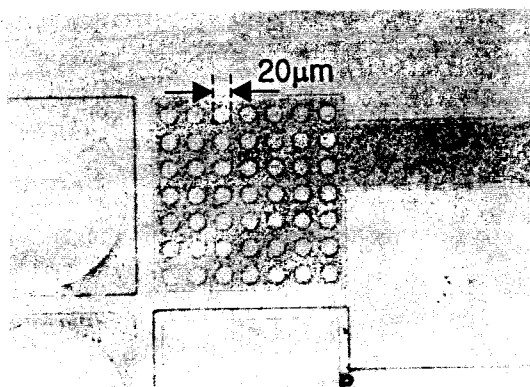


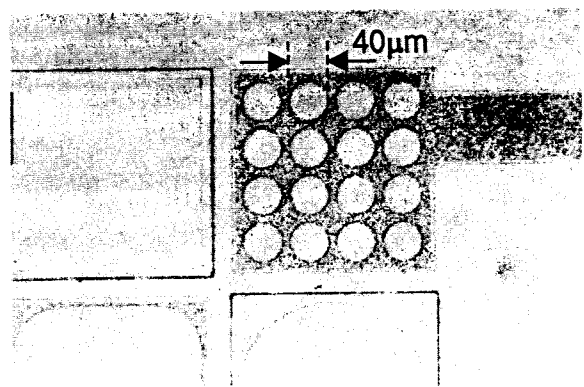
그림 3-7-23. 작업 전극과 기준 전극이 각각 4개씩으로 이루어진 Multi-electrode



(a) $r=2.5\mu\text{m}$, 20x20 array



(a) $r=10\mu\text{m}$, 7x7 array



(b) $r=20\mu\text{m}$, 4x4 array

그림 3-7-24. 제작된 미세 전극 배열 사진

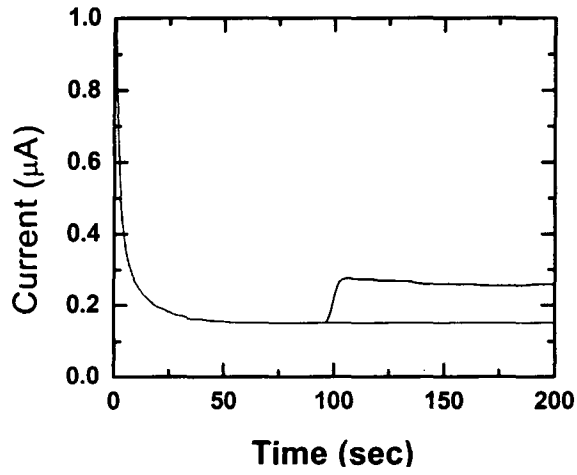


그림 3-7-25. Polypyrrole/GOD 전극의 glucose에 대한 응답특성 (glucose 2.5mM)

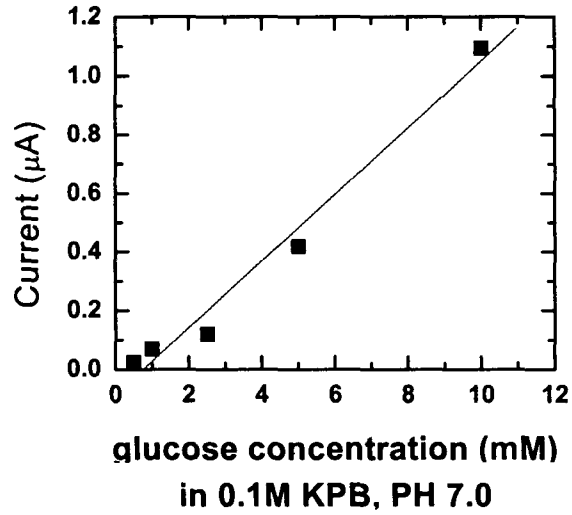


그림 3-7-26. Polypyrrole/GOD 에서의 calibration curve

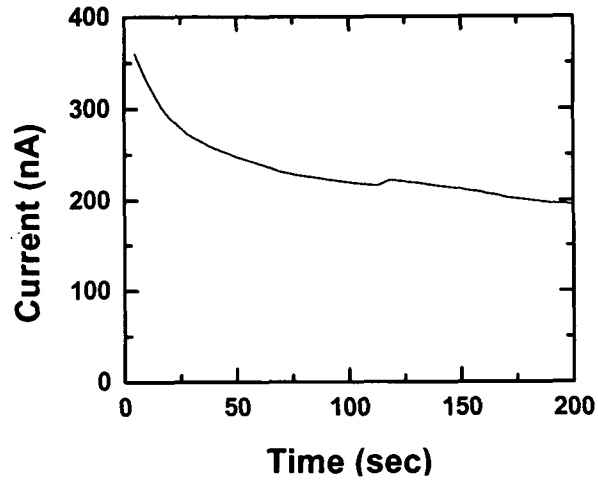


그림 3-7-27. 미세 전극의 응답 특성

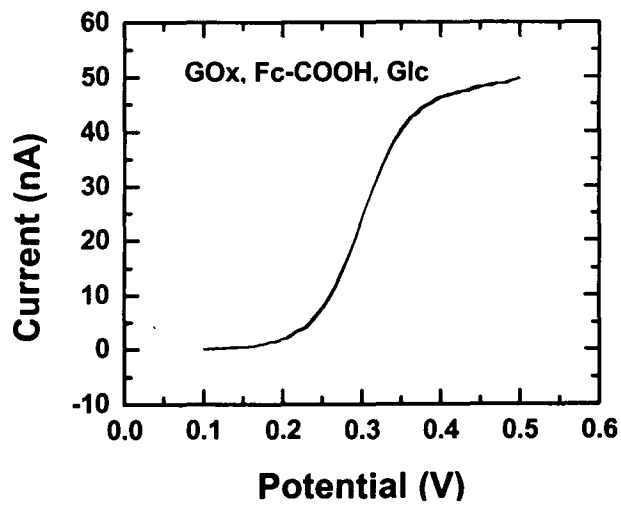


그림 3-7-28. 미세 전극 CV 특성 곡선

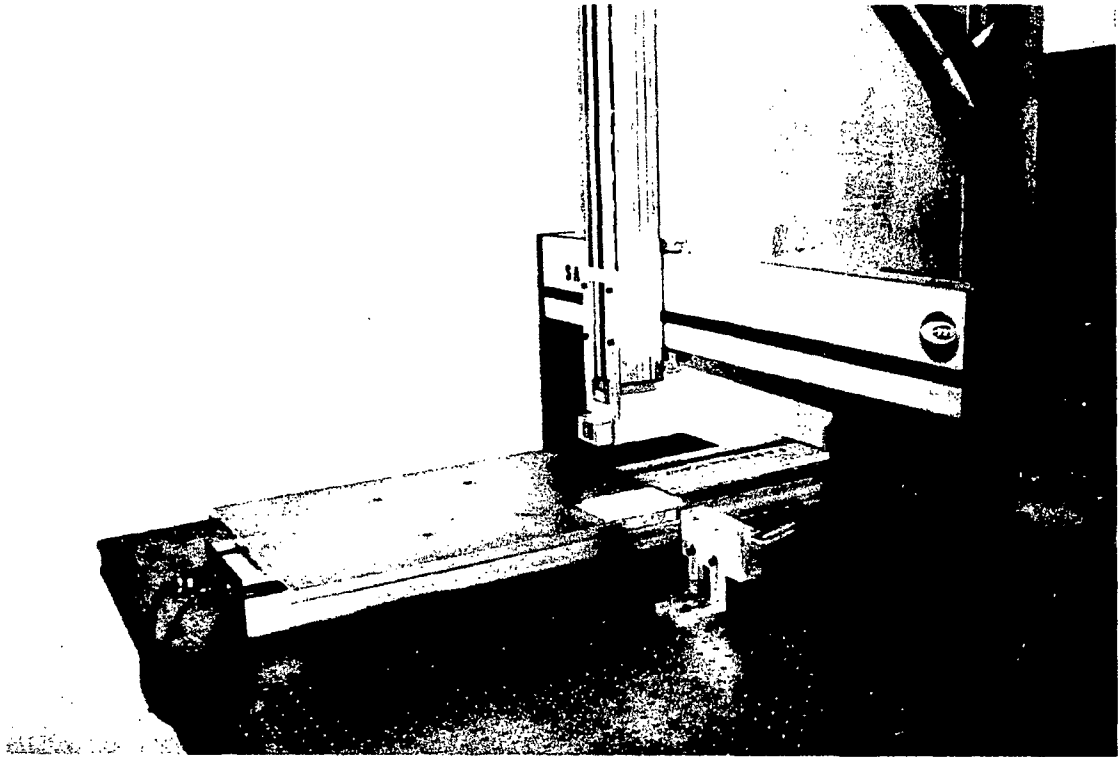


그림 3-8-1. DNA chip 자동제조 장치 (Microarrayer)

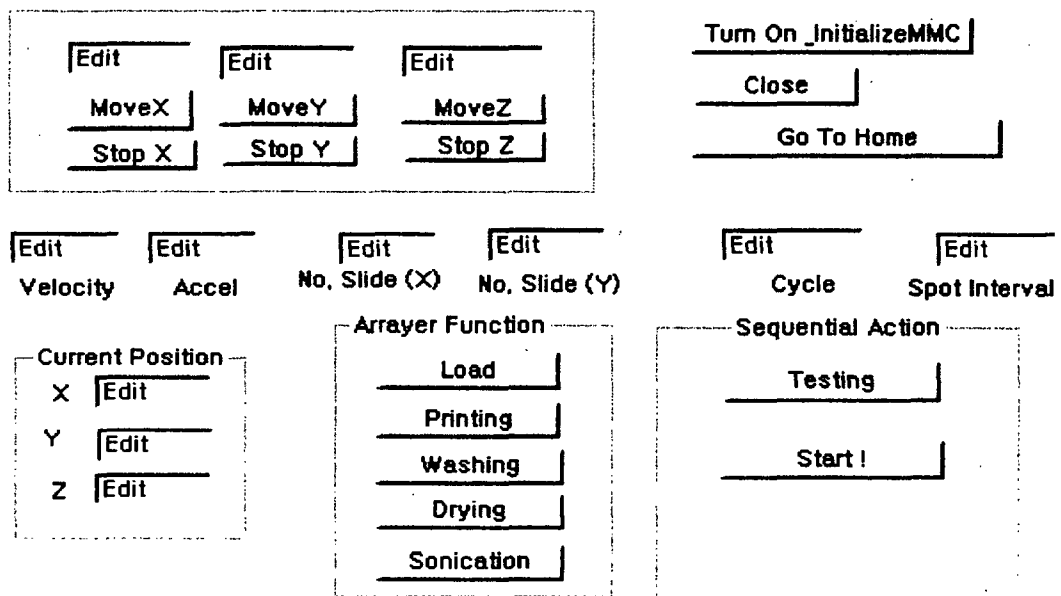


그림 3-8-2. Microarrayer operating program

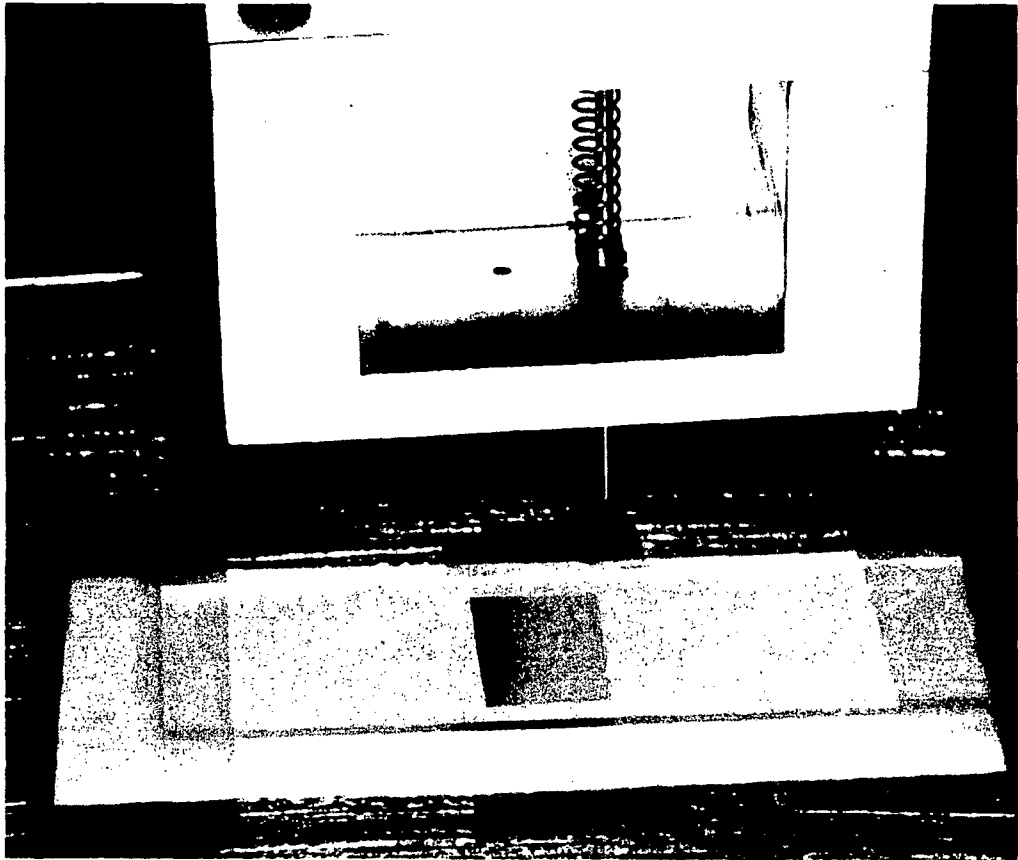


그림 3-8-3. Printing with ink (4,900ea/3.24 cm², cover glass size)

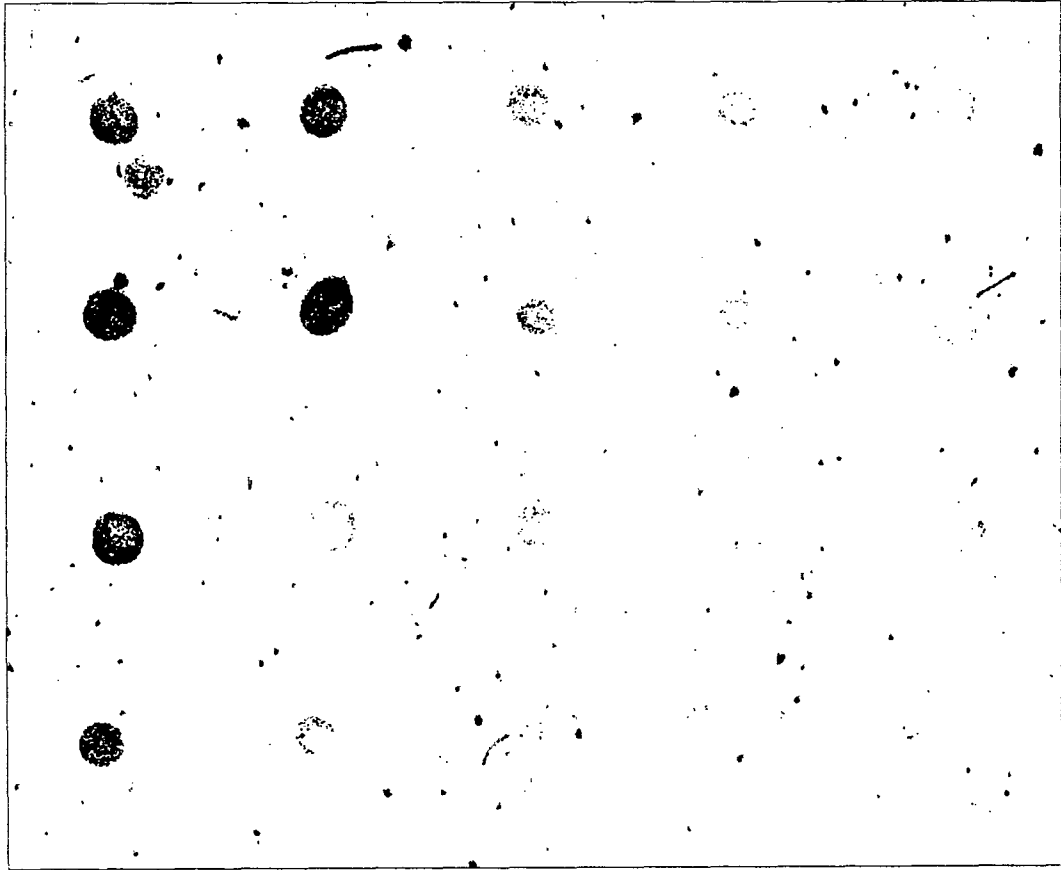


그림 3-8-4. 대장균의 heat shock response

- Heat shock condition: Cy5 labeled (red)
- Non-heat shock condition (Control): Cy3 labeled (green)

- 1, 2 열 : heat shock gene (dnaJ, groES)
- 3, 4, 5 열 : Positive control (sfcA, ompC, PEP-carboxylase kinase)