

MEA의 제작 및 특성 평가

성 락 선 · 박 정 호
고려대학교 전기공학과

Fabrication and Characterization of MEA

Nakseon Seong · Jungho Pak
Dept. of Electrical Engineering, Korea University

Abstract - A planar MEA(Multi-channel Electrode Array) has been developed for monitoring the electrical activity of electrogenic cells in a cell culture by an extracellular recording. The material, fabrication process, characterization of the array, cleaning effect and impedance according to opening size by impedance measurement are described.

1. 서 론

살아있는 생물에 대한 연구는 아직도 많은 연구가 필요 한 분야 중의 하나이다. Genome project라는 neuronal network, DNA chip과 같은 수많은 연구들이 그러한 필요성을 충분히 설명해 준다. 특히 신경 신호에 관한 연구의 경우 그 측정 대상인 세포의 크기가 수 μm 에서 수백 μm 정도의 크기를 갖는 것이 보통이기 때문에 측정이나 실험을 위해서는 수 μm resolution을 다룰 수 있는 기술이 필요하다. 최근 μm 크기의 물질을 다루는 MEMS 분야의 발전에 힘입어 신경 신호를 측정하고 분석하는 연구들이 활발히 전개되고 있다. 이러한 신경 신호는 MEMS 기술로 제작된 수 μm 크기의 electrode를 이용하여 측정할 수 있으며 multi-channel의 electrode를 이용할 경우 신호의 전달체계 연구에 더 효과적이다. 본 연구에서는 신경 신호 측정을 위한 MEA를 제작하여 impedance 측정을 통해 그 특성을 파악하였고 실제 신경 신호를 측정하였다.

2. 본 론

2.1 재료 물질

MEA는 4 층으로 구성된다. 우선 기판으로는 절연이 필요 없는 glass wafer를 사용하였다. Glass wafer의 경우 공정이 간편하며 실험시 세포의 위치와 분포양상을 쉽게 관찰할 수 있는 등의 장점을 가진다. 기판 위에 신경 신호의 전달시 신호의 손실을 최소화 할 수 있게 전도도가 좋고 toxic 하지 않은 Ti/Au 층으로 electrode 층을 형성하였고 절화막으로 passivation 층을 형성하였다. 절화막 층은 생체 친화적이며, 표면이 깨끗하게 세척된 경우 세포와 잘 접촉하여 물리적, 화학적으로 안정하고, 산화막과는 달리 이온의 출입이 불가능하므로 전기적인 절연에 적합하다.

2.2 제작 공정

MEA를 제작할 때는 먼저 기판인 glass wafer를 아세톤, 메탄올에 차례대로 2분 이상 넣은 뒤 DI water로 세척을 한다. 그 후 glass wafer 위에 전극으로 사용될 Ti(1000Å)/ Au(2000Å)을 증착한 후에 사진식각 공정으로 전극 영역을 정의한 다음 습식 식각으로 전극 부분을 패터닝한다. 전극용 금속인 Au는 glass 기판과의 결합력이 낮아 작은 영향에도 쉽게 벗겨지는 문제점이 있으므로, 이를 개선하기 위하여 금속층의 어닐링을

300°C hotplate에서 30분간 수행한다. 다음으로 금속 전극 사이의 전기적 절연을 위한 절화막(5000Å)을 증착한다. 사진식각 공정으로 세포가 닿을 안쪽 opening을 정의한 다음 건식 식각으로 패터닝하고 실험시 세포와 세포 배양액을 담을 수 있도록 실ガ드를 이용하여 유리판을 접착시키고, 세포가 위치할 안쪽 electrode를 세척해준다. 그럼 1은 제작 공정을 나타낸다.

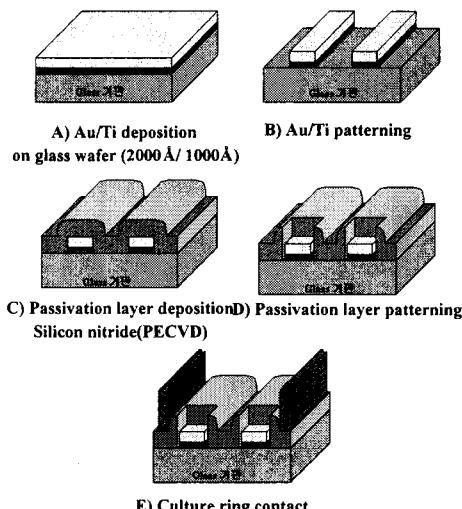


그림 1. MEA 제작 공정

2.3 Impedance 측정

신경 신호를 측정하기 위해서 세포에 전극을 접촉시킬 경우 세포에서 발현되는 신경 신호는 이온의 농도차로 인한 세포 내외막의 탈분극 형태로 나타나고 이 신호가 세포와 전극 사이의 전해질과 전극의 표면에서의 반응에 의해 전기적인 신호로 변환된다. 이때 전체 impedance 중에서 가장 큰 비중을 차지하는 전극과 전해질 표면에서의 impedance 값은 신경신호 측정시 전기적 특성에 많은 영향을 주게 된다. 따라서 MEA를 이용해 신경 신호의 측정을 하기 위해서는 전극 표면과 전해질에서의 impedance를 정확히 파악해야 한다. Impedance가 다를 경우 측정되는 신호의 파형이 달라지게 되며 [1] 이에 맞게 신호 측정 setup을 바꾸어야 하기 때문에 미리 impedance를 아는 것은 상당히 중요한 일이다.

이러한 Impedance를 측정할 때 전압으로 입력을 주게되면 출력단에서는 current 형태의 출력이 나오기 때문에 측정하기 쉬운 voltage로 출력 형태를 변환하기 위한 trans-impedance stage가 필요하다. Current를 voltage로 변환하는 경우 신호의 loss를 줄이기 위해서는 누설 current가 되도록 적어야 한다. 이러한 이유로

주로 OP-AMP를 이용한 회로를 많이 사용한다. OP-AMP를 이용하여 feedback 회로를 구성한 경우 이상적으로는 OP-AMP의 +, - 단자로 들어가는 input bias current가 0이기 때문에 모든 current가 loop를 구성하고 있는 저항에 걸리게 되어 OP-AMP의 출력단에서는 'current×저항'의 값을 가진 전압 형태의 출력이 나타난다.

또한 신경 신호 자체의 크기가 아주 작으므로 noise를 제거하기 위한 filter가 필요하며 신호의 크기를 관측 가능한 크기로 증폭하기 위한 증폭단이 필요하다.

Impedance를 측정할 때 필요한 filter 부분과 증폭 부분, trans-impedance stage를 포함하는 회로를 구성하여 그림 2에 나타내었고[2] simulation을 통해 전체 회로의 frequency response를 알아보았으며 그 결과를 그림 3에 나타내었다. 입력 신호의 크기는 100mV(200mV_{p-p})이며 frequency는 1Hz부터 1MHz까지 변화시켰다.

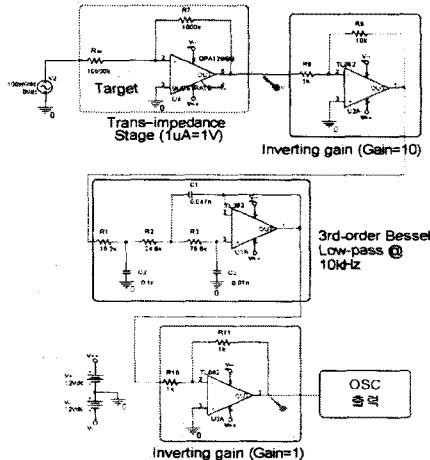


그림 2 Trans-impedance stage와 filter 및 증폭 회로

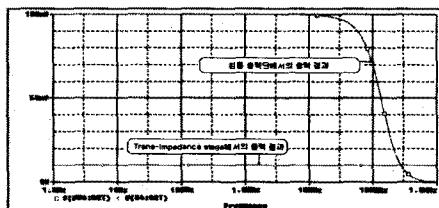


그림 3 회로의 Frequency response

그림 2에서 R_{IM} 값이 $10M\Omega$ 이므로 $R7/R_{IM}$ 의 비율에 의해 trans-impedance stage에서는 $100mV(200mV_{p-p})$ 인 입력 신호의 크기가 $1/10$ 으로 줄어들었으며 이 값이 inverting gain(10)을 통해 10배 증폭되어 출력단에서는 $100mV(200mV_{p-p})$ 의 크기가 나타내는 것을 그림 3에서 확인할 수 있다. 만일 impedance의 크기가 증가한다면 $R7/R_{IM}$ 의 값이 감소하게 되어 출력단에서의 전압은 더 작아지게 된다. 위의 회로에서 R_{IM} 의 실제 impedance 값은 $|Z| = \frac{200mV_{p-p}}{\text{측정전압 } p-p / 10 / 1M\Omega}$ 으로 계산된다. 즉, 전압값을 측정함으로 미지의 impedance를 계산할 수 있다. 또한 최종 출력단에서의 frequency response가 원래 설정했던 10kHz 영역 이후부터 LPF의 특성을 나타내므로 수 kHz의 신경 신호를 측정할 때 적합

하며 마지막 출력단에서 신호의 크기를 증폭하므로 신경 신호를 관찰하기가 더 용이하다. MEA의 impedance를 측정하기 위해서는 그림 4와 같이 측정을 위한 회로를 구성한다.

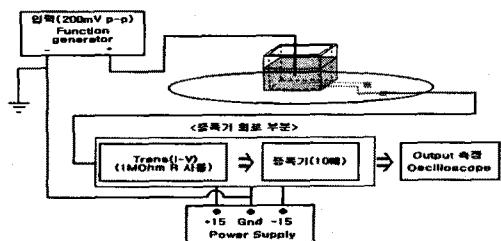


그림 4 Impedance 측정 set

Impedance를 측정할 MEA를 고정시킨 다음 normal ringer solution(세포 배양액)을 가운데 well에 붙고 1 kHz, $200mV_{p-p}$ sine wave를 가한 후 출력단에서의 p-p 전압을 OSC로 측정하여 $|Z| = \frac{200mV_{p-p}}{\text{측정전압 } p-p / 10 / 1M\Omega}$ 으로 impedance의 크기($|Z|$)를 계산하고 초기 입력 전압과 출력단 전압의 비율을 비교하여 phase 차(θ)를 계산한다. 크기와 phase를 이용하여 $|Z| \angle \theta$ 로 impedance를 계산한다. 본 연구에서는 impedance의 크기만을 측정하였다.

2.4 Opening 면적에 따른 impedance

G134와 G136을 이용하여 면적에 따른 impedance를 측정하였다. Opening 면적은 16개씩 $1200\mu\text{m}^2$, $600\mu\text{m}^2$, $500\mu\text{m}^2$, $1500\mu\text{m}^2$ 이다. 두 MEA에서 opening 크기에 따른 impedance 측정결과를 그림 5과 6에 나타내었다.

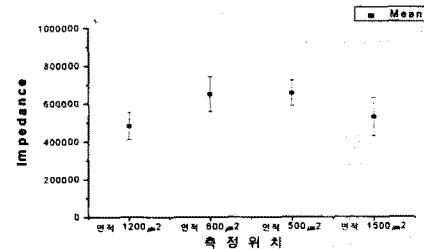


그림 5 G134에서 opening 크기에 따른 Impedance

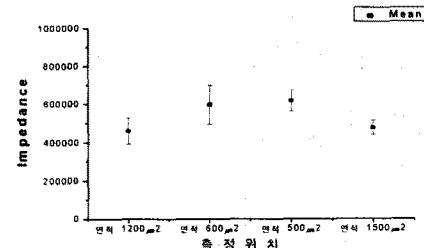


그림 6 G136에서 opening 크기에 따른 Impedance

그림 5과 6에서 opening 면적과 impedance는 반비례

례 관계가 있음을 확인할 수 있다. 즉, opening이 클수록 impedance 값이 적어짐을 확인할 수 있다.

2.5 Cleaning에 의한 impedance 변화 양상

MEA에 세포를 배양하고 신호를 취득하기 위해 여러 가지 처리와 실험을 하면 세포는 며칠 가지 못해서 죽거나 신호의 level이 변하거나 파형 왜곡이 일어난다. 이러한 경우 기존의 세포들을 제거하고 새로운 세포들을 배양해야 하는데 이때 기존의 세포 및 기타 씨꺼기와 같은 이물질을 제거해야 한다. 이러한 과정을 cleaning이라 한다. Cleaning을 하는 과정은 먼저 DI water와 95% 알콜로 번갈아 세척한 다음 질산(원액)에 담그었다가 다시 DI water와 95% 알콜로 번갈아 4~5회 정도 세척한다.

Cleaning에 따른 MEA의 impedance 변화를 알아보기 위하여 G127과 G132를 5차례 cleaning하면서 각 cleaning 후에 impedance를 측정하였다. G127에서 opening 면적이 $1200\mu\text{m}^2$ 인 16개의 pad에서 impedance를 측정한 결과를 그림 7에 표시하였다.

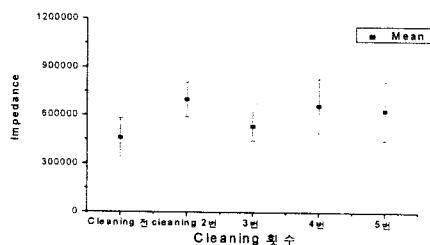


그림 7 G127 opening 면적이 $1200\mu\text{m}^2$ 인 pad의 cleaning에 따른 impedance

G127의 다른 pad들에서도 유사한 결과를 보였다. G132 impedance 측정에서도 거의 동일한 impedance 값을 보여주었다. 그림 7에서 보듯이 MEA를 cleaning 하여도 impedance 값이 크게 변하지 않음을 확인할 수 있다. 따라서 cleaning을 실시해도 MEA에는 크게 영향이 없음을 알 수 있었다.

2.6 Action potential 측정

쥐의 소뇌에 있는 granular 세포들을 opening된 electrode 부위에 culture하여 현미경을 통해 세포와 접촉한 channel 만을 선택하여 신호를 검출하였다[3]. G139에서 하나의 electrode로부터 측정된 action potential을 그림 8의 원편에 나타내었고 그중 하나의 action potential을 확대하여 오른편에 나타내었다. 측정 결과 action potential의 전형적인 모습을 관찰할 수 있었다.

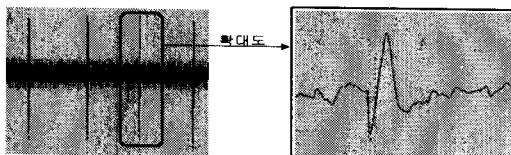


그림 8. 측정된 action potential(1 channel)

그림 9의 원편은 G139 MEA에서 spacing이 $165\mu\text{m}$ 인 두 electrode에서의 신호를 관찰한 것이다. 신호의 일부를 확대하여 오른편에 나타내었다. 두 신호를 비교해 보면 위상차가 거의 나지 않고 신호의 크기도 비슷함을 볼 수 있다. 또한 신호의 모양이 감소하다가 증가하는 경우와 증가하다가 감소하는 두 경우를 모두 볼 수

있다. 두 가지 형태의 신호 모두가 전형적인 action potential의 모양이며 이러한 형태의 차이는 신호 측정 시 impedance 값의 차이로 인한 것이다[1].

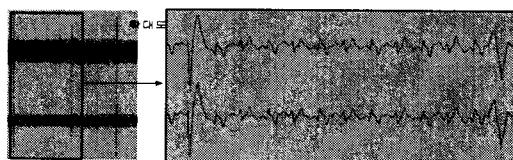


그림 9. 측정된 action potential(2 channel)

3. 결론

본 논문에서는 MEA를 제작하고 impedance 측정을 통해 electrode의 특성을 살펴보았다. 제작된 MEA는 수백 $\text{k}\Omega$ 에서 수 $\text{M}\Omega$ 정도의 impedance 값을 가지며 질산을 이용하여 cleaning하여도 impedance가 크게 변하지 않음을 확인하였다. 또한 opening 면적과 MEA의 impedance는 서로 반비례 관계임을 확인하였고 MEA를 이용하여 신호를 측정하였다.

MEA에서 impedance를 측정하는 것은 신경에서 발현하는 신호를 정확하게 측정하기 위해 필수적이다. 보다 다양한 실험을 통해 MEA의 impedance를 modeling한다면 실제 신호를 분석하는데 크게 도움이 될 것으로 생각된다.

(참 고 문 헌)

- [1] Macro Bove, Massimo Grattarola, Sergio Martinio, Giovanni Verreschi "Interfacing cultured neurons to planar substrate microelectrodes : characterization of the neuron-to-microelectrode junction." Bio-electrochemistry and Bioenergetics 38, pp. 255-256, 1995
- [2] Sedra and Smith, "Microelectronic Circuits," 4th Ed., Oxford, pp. 60-109, 1997
- [3] U. Egert, B. Schlosshauer, S. Fennrich, W. Nisch, H. Hammerle, "A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays." Brain research Protocols 2, 1998, pp. 229-242