

DNA 측정용 SH-SAW 센서 개발

허영준*, 선주현**, 노용래***

* 경북대학교 기계공학부

***경북대학교 센서공학과

**** 경북대학교 기계공학부

Development of an SH-SAW sensor for detection of DNA

Youngjune Hur*, Jooheon Seon**, and Yongrae Roh***

*School of Mechanical Engineering, Kyungpook National University

**Department of Sensor Engineering, Kyungpook National University

***School of Mechanical Engineering, Kyungpook National University

*hurnet@bcline.com, **awakened@chollian.net, ***yryong@knu.ac.kr

요약

본 연구에서는 DNA의 상보적인 결합을 이용하여 DNA 혼성화 반응을 감지할 수 있는 SH형 SAW 센서를 개발하였다. 측정에 사용된 DNA는 15개의 염기를 가진 올리고뉴클레오티드를 사용하였으며 이에 대해 상보적 결합이 가능한 염기서열을 가진 것과 그렇지 않은 미스매치 형태의 DNA 올리고뉴클레오티드를 이용하여 DNA 혼성화 반응 특성을 측정하였다. SH형 SAW 센서는 압전 단결정 LiTaO₃를 사용하여 100 MHz로 발전되는 형태로 제작하였으며, 센서의 지연선 위에 Ti/Au 층을 증착하여 SH기가 수식된 탐침 DNA의 고정화가 가능하게 하였다. 제작된 센서는 Au가 증착된 박막위에 탐침 DNA를 SAM 방법으로 고정화 시켰을 경우와 고정화된 탐침 DNA와 표적 DNA와의 혼성화 반응을 시키고 난 후의 센서의 주파수 변화를 각각 측정하였다. 개발된 DNA 혼성화 반응 측정용 SH형 SAW 센서는 DNA 혼성화 특성에 기인한 질량하중 효과에 따른 안정적인 주파수 변화를 나타내었다.

1. 서론

최근 생명공학의 혁명적인 발달과 더불어 가장 관심을 끄는 기술 중의 하나가 DNA (Deoxyribonucleic Acid) 센서 기술이다. 이러한 DNA 센서는 고체기질 위에 붙여놓은 탐침 DNA (Probe DNA)와 검색하고자 하는 표적 DNA (Target DNA) 사이에서 상보적인 혼성화반응 (Complementary Hybridization)이 일어나는 것을 이용하여 표적 DNA 내에 특정 DNA의 염기서열 분석을 통해 유전적인 질병은 물론 전염병 등을 진단하고자 하는 노력들이 시도되고 있다[1,2]. DNA의 염기서열을 분석하는 방법으로는 질량분석, 광을 이용한 분석, 전기화학적 분석법이 일반적으로 사용되고 있다[3-5]. 이러한 방법 등은 고가의 대형 장비를 이용해야 하거나, 분석의 단계가 복잡하고 또한 훈련된 기술자가 필요하다는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근에는

높은 민감도를 가지는 초소형 센서의 개발이 요구되고 있다[6]. 이러한 관점에서 특히, 음향파를 이용한 DNA 센서에 대한 관심이 증대되고 있다. 음향파를 이용한 DNA 센서로는 두께 진동 모드를 이용한 QCM (Quartz Crystal Microbalance)과 표면탄성파를 적용한 SAW (Surface Acoustic Wave) 센서가 있다. 일반적으로 QCM 센서는 간편하고 사용하기 쉽기 때문에 가장 보편적인 압전 기기로 사용되고 있고, DNA 센서로 일찍이 사용되어 왔다[7]. 하지만, QCM 시스템의 주요한 단점은 저분자량의 생체물질 측정시 감도 신뢰성이 떨어진다는 점이다[8]. 따라서 이러한 한계를 극복할 수 있는 고감도의 센서를 개발할 필요가 있다. 따라서, 본 연구에서는 QCM의 낮은 감도 특성을 해결하고, 우수한 선형성, 연속 측정성, 디지털출력에 따른 전자시스템과의 접합 용이성, 반도체 공정기술을 이용하여 센서의 집적화와 소형화를 이룰 수 있는 DNA 측정용 SAW 센서를 개발하고, 제작된 센서를 사용하여 DNA의 선택적인 상보적 결합 반응을 측정하고자하였다. DNA 센서의 측정대상은 통상 다량의 수분을 함유하고 있는 생체 용액이기 때문에 측정 환경이 액상이라고 할 수 있으며, DNA의 혼성화 반응을 감지하기 위해서는 높은 감도 및 신호 안정성을 요구한다. 보편적으로 널리 사용되는 Rayleigh 파로 구현한 SAW 센서는 수중으로의 에너지 손실이 크게 발생하기 때문에 DNA 센서용으로는 적합하지 않다. 반면 표면에서 전단 방향의 변위를 가지며 전파하는 SH(Shear Horizontal)-SAW를 이용하면 액상에서의 SAW 에너지 감쇠가 적고, 신호 대 잡음비와 시스템 안정성에서 우수한 특성을 가진다[9]. 또한 센서의 질량 민감도는 작동 주파수의 제곱에 비례하므로, SAW를 사용할 경우 작동 주파수가 통상의 QCM 센서에 비해 높기 때문에 DNA의 상보적 혼성화 반응을 정확히 탐지하는데 유리하다.

본 연구에서는 이러한 배경에 의해 36° YX LiTaO₃ 압전 단결정을 사용하여 작동 주파수 100 MHz로 발전되는 SH-SAW 센서를 개발하였다. 제작된 SAW소자의 지연선 위에 측정 대상인 표적 DNA에 대해서 선택적으로 결합이 가능한 탐침 DNA를 고정화시켰다. 실험에서 사용된

DNA는 합성 올리고뉴클레오타드 (Oligonucleotide)를 사용하였으며 DNA끼리의 혼성화 반응을 감지하기 위해 표적 DNA는 탐침 DNA와 완전히 상보적(Complementary) 결합이 가능한 것과 상보적 결합을 할 수 없는 미스매치(Mismatch) 염기서열을 가지는 것을 사용하였다. 따라서 탐침 및 표적 DNA가 상보적인 경우에만 DNA 혼성화 반응이 일어남을 이용하여 센서의 지연선 위에서 일어나는 DNA 혼성화 반응에 기인한 질량의 증가가 SAW의 속도 변화를 발생시키고, 이러한 SAW 센서에서의 속도 변화가 센서의 주파수 변화로 나타낼 수 있다. 이때 SAW 센서의 주파수 변화를 측정하면 DNA의 혼성화 반응의 정도를 분석할 수 있다고 판단된다. 또한, 최근 DNA, 단백질 신폴과 같은 생물학적 물질의 특정 반응을 측정할 수 있는 마이크로, 나노 단위의 센서의 개발이 크게 요구되고 있다. 본 연구에서는 이러한 요구에 부응하여 음향파를 이용한 초소형 DNA 센서를 제작하였으며, 이는 유전자공학, 분자생물학, 생명공학 등의 DNA 연구분야에 응용될 수 있을 것이다.

II. 제작

본 연구에서는 압전 단결정 $36^\circ\text{YX LiTaO}_3$ 를 사용하여 측정 채널과 기준 채널의 이중 지연선 채널로 구성된 SAW 센서를 제작하였다. 기판으로는 LiTaO_3 결정의 36°Y 축 절단면과 X축 전과 방향을 이용하여 횡단 방향의 변위 분극을 가지는 SH-SAW를 발전시키도록 하였다. 압전 기판 위에 증착된 IDT (Inter-Digital Transducer)는 100 MHz의 SAW를 발생시키도록 주기가 $40.38 \mu\text{m}$ 가 되도록 제작하였다. 제작된 소자는 그림 1과 같이 두 개의 개별 SAW 소자가 병렬로 결합된 형태를 가지며, 각 각의 SAW 소자는 압전 단결정 기판 위에 설치되는 입력/출력용 IDT로 구성된다. 이중 지연선 형태를 취하여 SAW를 둘러싼 모든 환경이 노출된 디바이스를 기준 채널(Reference Channel)이라 하고, 지연선 상에 특정 감지막을 증착시켜서 SAW가 주위 환경과 더불어 특정 측정변수에 더 많이 반응을 할 수 있도록 한 디바이스를 측정 채널(Sensing Channel)이라고 한다.

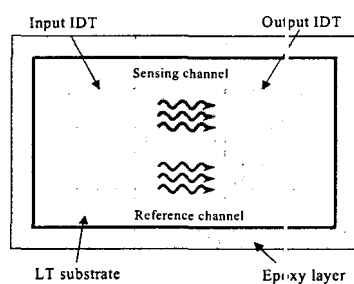


그림 1. 이중 채널의 SAW 소자.

그림 1에서 보듯이 측정 채널에 DNA를 잘 고정시킬 수 있는 박막을 증착한 다음, 측정 채널과 기준 채널의 신호 차이를 구하면 그 결과는 DNA에만 반응한 신호가 될 것이다. 센서의 각 지연선은 오실레이터로 구현된다. 센서의 입력 IDT는 SAW 에너지가 지연선 방향으로 집중되도록 SPUOT(single phase uni-directional transducer)형태로 설계하였다. 또한 LiTaO_3 압전 기판의 가장자리에서 원하지 않는 SAW의 반사를 감쇠시키기 위하여, 폴리머 계열의 에폭시 층을 7 판의 뒷면과 바닥에 도포하였다. 또한 SAW 소자가 수중환경에서 작동

하기 때문에 IDT와 신호 연결부의 절연처리가 필수적이다. 절연 물질은 SAW 소자와 수용액의 접촉을 차단해야 하며, 도포시 SAW에 최소한의 감쇠효과를 가져야 한다. 이러한 요구 조건을 만족시키기 위해 IDT와 신호 연결부 전체를 상온 경화형 실리콘 고무로 도포하였다. 제작된 SAW 센서의 사진을 그림 2에 나타내었다.

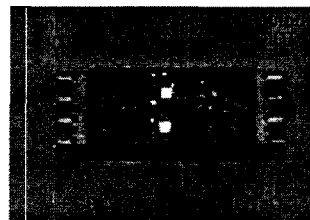


그림 2. 제작된 SAW 센서.

III. 실험 및 측정

3. 1. 시료

본 연구에 사용된 모든 DNA는 (주)제노텍에서 $1 \mu\text{mol}$ 스케일로 위탁합성한 것을 구입하였으며 HPLC로 정제한 후 동결건조된 것을 사용하였다. 실험에 사용된 DNA 올리고뉴클레오타드의 염기서열은 다음과 같다.

Probe: 5'-GTT CTT CTC ATC ATC-3'
Target (Complementary): 5'-GAT GAT GAG AAG AAC-3'
Target (Mismatch): 5'-GTT CTT ATC ATC-3'

이상의 DNA는 모두 TE 완충용액(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH7)으로 $100 \mu\text{M}$ 의 농도로 녹여서 사용하였다.

3. 2. Probe DNA Immobilization

SAW 센서를 DNA 센서로 활용하기 위해서, 우선 센서의 측정 채널 지연선 표면에 Ti를 증착한 후 그 위에 다시 Au막을 열증착기를 이용하여 증착하였다. 여기서 Ti는 Au막과 압전 기판 사이의 접착성을 향상시키기 위하여 완충층(buffer layer)으로 사용하였다. 싸이올(thiol)이 수식된 탐침 DNA는 자가조립 단분자(Self-Assembled Monolayer, SAM) 형성법을 사용하여 Au 박막위에 다음과 같은 과정으로 고정화시켰다.

먼저, 지연선 위의 Au 표면을 아세톤, 메탄올, 탈이온수의 순서로 깨끗하게 세척하였다. 그 다음, 말단에 싸이올이 수식된 탐침 DNA (5'-GTT CTT CTC ATC ATC-3')를 TE 완충용액으로 $1 \mu\text{M}$ 이 되도록 용해한 다음 이를 마이크로피펫을 이용하여 세척된 Au 표면에 떨어뜨려 5시간 동안 반응시켰다. 이상으로 측정 채널 표면에 탐침 DNA를 고정하였다.

3. 3. Target DNA Hybridization

탐침 DNA가 고정화된 Au 표면에 측정대상인 표적 DNA를 1 M NaCl를 첨가한 TE 완충용액에 $1 \mu\text{M}$ 농도로 녹여 DNA 혼성화 용액을 제조한 다음 이 용액을 적하하여 2시간 동안 혼성화 반응을 시켰다. 표적 DNA는 상보적인 결합이 가능한 구조 (5'-GAT GAT GAG AAG AAC-3')와 미스매치(5'-GTT CTT ATC ATC-3')의 2종류를 사용하여 SAW 센서로 DNA 혼성화 반응 감지특성을 확인하였다.

그림 3에는 지연선 위에 탐침 DNA가 고정화된 경우

와 탐침 DNA와 표적 DNA가 혼성화 반응하여 서로 결합한 경우의 감지막의 형태를 개략적으로 나타내었다.

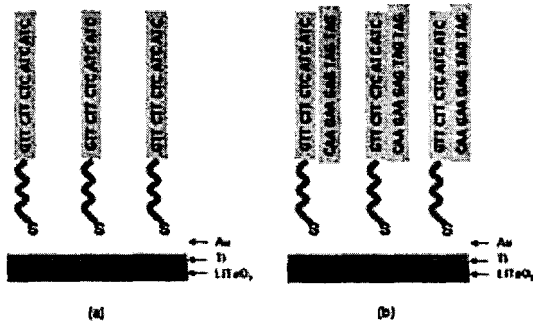


그림 3. DNA 고정화 및 혼성화 개략도: (a) 탐침 DNA 고정화 (b) 탐침 DNA와 표적 DNA의 혼성화.

3. 4. 측정

본 연구에서는 SAW 센서의 DNA 고정화 및 혼성화 반응의 동작 및 감지신호 획득을 위하여 고주파 소자의 전달 특성 측정장치인 네트워크 분석기 (Network Analyzer, HP 8752C)를 사용하였다. 탐침 DNA와 표적 DNA를 반응시키기 전의 SAW 소자의 전달 특성과 탐침 DNA를 고정화시킨 후의 소자의 전달 특성 및 탐침 DNA와 표적 DNA와의 혼성화 반응이 완전히 끝난 소자의 전달 특성을 측정하여 비교하여 보았다. 그림 4에서 보듯이 각 단계별 반응에 따라 SAW 센서의 주파수 스펙트럼의 삽입손실이 미약하게 증가 하였지만 전체 스펙트럼은 초기 상태를 유지함을 알 수 있다.

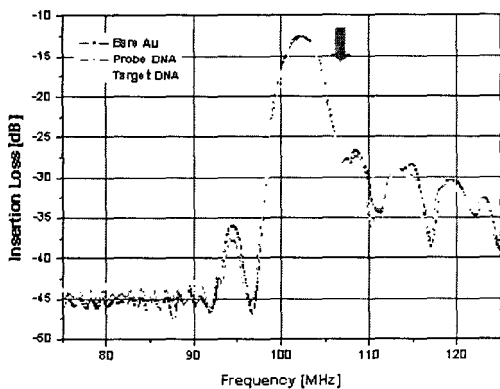


그림 4. DNA 반응 단계별 주파수 스펙트럼.

네트워크 분석기를 사용하여 측정한 결과는 삽입 손실이 발생함으로써 지연선 위에 탐침 DNA가 고정화 되었으며, 또한 고정화된 탐침 DNA가 표적 DNA와 결합하였음을 보여주었다. 그림 5에 탐침 DNA와 표적 DNA 사이의 혼성화 반응 전후의 주파수 변화를 나타내었다. 그림에서 보듯이 반응 전후에 확연한 주파수 변화를 보임으로써, SAW 센서를 이용하여 DNA 센서로 이용 가능함을 알 수 있었다.

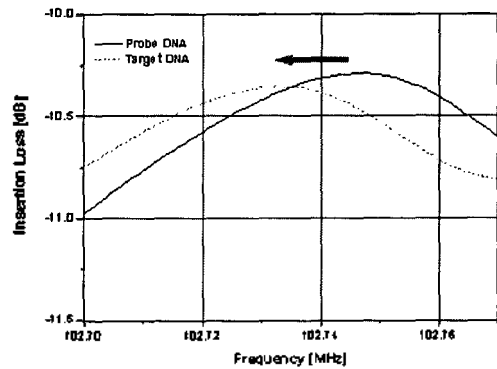


그림 5. DNA 혼성화 반응 전후의 주파수 스펙트럼.

IV. 결론

본 연구에서는 DNA의 상보적인 결합(hybridization)에 의한 DNA 혼성화 특성을 감지 할 수 있는 SH-SAW 센서를 개발하였다. 36°YX LiTaO₃ 압전 기판을 사용하여 SAW 소자를 제작하고, SAW 센서 시스템을 구성함으로써, 탐침 DNA가 고정화된 지연선 위의 표적 DNA가 선택적으로 결합함에 의한 질량 하중 효과를 주파수 변화로 측정할 수 있었다. 개발된 센서는 측정 주파수와 DNA 혼성화 반응이 일어남에 따라 안정한 관계를 보였다. 현재 동일한 목적으로 이용되는 대표적 장비인 광학 변환기 SPR(surface plasmon resonance)에 비해, SAW 센서의 감도 특성은 다소 낮지만, 장치 및 설비가 간단하고, 저가에 구현 가능하며, 반도체 기술과 접목한다면 센서의 출력이나 측정 방법 등을 집적화한 초소형 센서로 구현할 수 있는 장점을 가진다. 또한 Sauerbrey 방정식에 따르면 음향 공진 센서의 감도는 공진 주파수의 제곱에 비례하므로, 더 높은 감도를 구현 할 수 있을 것이다. 본 연구에서 개발된 SH-SAW 센서는 감지층으로 다양한 염기서열의 DNA를 사용하여 생명공학 연구의 중요한 부분인 유전자 연구에 기여할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Benjamin Lewin, "GENES VI", Oxford University Press and Cell Press, 1994, pp. 89-90.
2. K. Skogerboe, "Molecular Biology Techniques", Anal. Chem., 65, 416-419, 1993.
3. Y. Cui, Q. Wei, H. Park, and C. M. Lieber, "Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species", Science, 293, 1289-1291, 2001.
4. G. Marra and P. Schar, "Recognition of DNA alteration by the mismatch repair system", Biochemical Journal, 338, 1-13, 1999.

5. T. Nordstorm, M. Ronaghi, L. Forsberg, U. DeFaire, R. Morgenstern, and P. Nyren, "Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31, 107-112, 2000.
6. I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, A. L. Ghindilis and E. Wilkins, "Development of a flow-through immunoassay system", *Sensors and Actuators B*, 49, 202-210, 1998.
7. Keiko Ito, Koji Hashimoto, Yoshio Ishimori, "Quantitative analysis for solid-phase hybridization reaction and binding reaction of DNA binder to hybrids using a quartz crystal microbalance", *Anal. Chim. Acta*, 327, 29-35, 1996.
8. P. B. Lippa, L. J. Sokoll and D. W. Chan, "Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry", *Clinica Chimica Acta*, 314, 1-26, 2001.
9. W. Welsch, C. Klein, M. V. Schickfus and S. Hunklinger, "Development of a surface acoustic wave immunosensor", *Anal. Chem.*, 68, 2000-2004, 1996.