

DNA Chip Microarrays를 위한 template로서 소수성 패턴의 제작

최 용성, 박대희

원광대학교

Fabrication of Hydrophobic/Hydrophilic Pattern as a Template for DNA Chip Microarray

Yong-Sung Choi, Dae-Hee Park

Wonkwang University

Abstract

Microarray-based DNA chips provide an architecture for multi-analyte sensing. In this paper, we report a new approach for DNA chip microarray fabrication. Multifunctional DNA chip microarray was made by immobilizing many kinds of biomaterials on transducers (particles). DNA chip microarray was prepared by randomly distributing a mixture of the particles on a chip pattern containing thousands of μ -scale sites. The particles occupied a different sites from site to site. The particles were arranged on the chip pattern by the random fluidic self-assembly (RFSA) method, using a hydrophobic interaction for assembly.

Key Words : DNA Chip Microarray, Microfabrication technology, Hydrophobic interaction, Random fluidic Self-Assembly, Particle, Chip pattern

1. 서론

최근, DNA칩을 비롯한 다종류의 생체재료를 마이크로머신 기술 (Micro Electro Mechanical System, MEMS)을 이용하여 하나의 칩에 집적화한 디바이스가 주목받고 있다. 단순히 많은 분석을 동시에 할 수 있을 뿐만 아니라, 미소화에 의한 시약이나 시료의 소비량을 억제하고, 단일종 또는 수종류의 인식재료로부터는 알 수 없는 복합적인 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대되고 있다.

DNA칩의 제작 방법은 크게 나누어 리스그래픽을 이용한 방법과 스탬프를 이용한 방법으로 나눌 수 있다 [1-3]. 전자는 고상합성에서 신장말단 (伸張末端)의 탈보호기 반응을 광반응으로 행하는 것으로, 조사 (照射) 위치를 결정하는 마스크

패턴의 조합에 의하여 임의의 배열을 미소한 spot으로서 형성할 수 있다 [2-9]. 그러나, 고상합성의 제한으로서 신장가능한 길이가 20~30mer 정도로 짧고, 큰 분자의 구축에는 적합하지 않다. 후자는 미리 준비한 다종류의 재료를 단순한 자동화된 장치에 의해 칩 끝에 붙여 칩상에 옮기는 것이다. 이 방법은 재료의 제약이 없으나, 옮기는 전량이 고정화되지 않거나 인접 사이트와의 contamination 등의 문제가 있다 [7-9].

따라서, 본 논문에서는 다항목측정 및 고정적 레이형 DNA칩의 개발을 위하여 생체재료의 새로운 고정화 방법을 제안하였다. 즉, 생체재료를 칩상에 직접 고정화하는 것이 아니고 미소담체 (particles)에 고정화한 후, 담체를 칩상에 고정화하는 2단계고정화이다. 제2단계고정화법으로서는 번잡함을 경감하는 방법으로서 미소화된 담체군 (群)

의 무작위액중자기조직화법 (random fluidic self-assembly method)에 의한 소수성상호작용 (hydrophobic interaction)을 이용하였다. 이 방법에 의하면 고정화 재료 종류의 증가나 고정화 영역의 미소화에 대해서도 그 공정이 번잡하게 되지 않고, 생체재료에 변성이 발생하지 않고 고정화할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 많은 분석을 동시에 할 수 있으며, 미소화에 의하여 시약이나 시료 소비량의 억제나 복합적 정보의 취득이 기대되고 있다. 본 논문은 이를 위한 미소담체의 제작, 배치의 친화력으로서 얇은 판 (plate)을 다이싱 (dicing)하여 얻은 미소담체와 패턴화 소수성막을 갖는 기판과의 소수성상호작용을 이용한 방법과 그 결과에 대하여 기술하였다.

2. 시료 및 실험방법

2.1 시약

CPFP (cyclized perfluoro polymer, 상품명 : CYTOP, 형번:CTL-809M) 및 CPFP의 용제액인 $(C_4F_9)_3N$ (형번:CT-Solv180)은 Asahi Glass Co.의 것을 사용하였다. 3,3'-dithiodipropionic acid는 PFALTZ&BAUER사의 것을 사용하였다. 기판 초음파세척용의 아세톤 (CH_3COCH_3), NHS(N-hydroxysuccinimide, $C_4H_5NO_3$), 아비딘 (Mw 67,000, from white egg), Tris[2-Amino-2-hydroxy methyl-1,3-propanediol], $H_2NC(CH_2OH)_3$, 염화나트륨 (NaCl), 2-아미노에탄올 ($H_2NCH_2CH_2OH$), 요화칼륨 (KI), 수산화나트륨 (NaOH), 페리시안화칼륨 ($K_3[Fe(CN)_6]$)은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.의 것을 사용하였다. EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidehydrochloride, $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$)은 Tokyo 화학공업의 것을 사용하였다. 생체재료로서는 5'말단에 각각 비오틴 및 FITC (fluorescenceisothiocyanate)를 수식한 $0.2\mu m$ 스케일의 이중나선 DNA를 Nisshinbo에 위탁합성하여 사용하였다.

후막용 positive 레지스트인 OFPR-800과 그 전용현상액인 NMD-3:2.38 (산업용)은 Tokyo Applied Chemistry동경화학공업의 것을 사용하였다. 그리고, negative레지스트인 XP SU-8(50)와 전용현상액은 MicroChem Co.의 것을 사용하였다.

요소(I)는 안전화학의 것을 사용하였다. 기관세정용 용매로는 전자공업용 (Kanto Chemistry) 아세톤을, 기타 시약으로는 화학·생화학용특급 또는 그 상당품을 사용하였다. 물은 클린룸 프로세스에서는 초순수 ($18.0M\Omega \cdot cm$)를, 기타의 경우에는 증류수 ($49.5 \times 10^{-6}S/cm$, pH4.86)를 사용하였다.

2.2 cover glass의 미소가공 및 패턴칩의 제작

cover glass의 미소가공에 대한 모식도를 그림

1에 나타내었다. 우선, cover glass 기판 ($0.13 \sim 0.16mm$, $18mm \times 18mm$, Takahashi Giken, Glass Co.)이 표면은 초음파세척기 (W-222, Honda)를 이용하여 순수, 아세톤, 순수의 순서로 각각 30분간 세정하였다. 그리고, cover glass의 한쪽면은 스펀 코팅기 (1H-D3, MIKASA)를 이용하여 500rpm에서 10초, 1,000~4,000rpm에서 20초간으로 회전하면서 $(C_4F_9)_3N$ 용제액으로 0.45~9.0wt-%의 농도로 희석시킨 CPFP를 퍼펫하여 $100\mu L$ 적하시킴으로서 $0.5 \sim 2.0\mu m$ 의 두께로 코팅하여 소수성으로 하였다. 다음에, $115^\circ C$ 의 항온오븐 (DS64, YAMATO SCIENTIFIC)중에 넣고 4시간 하드베이킹하였다. 그리고, 그 반대면에 텅스텐보트를 이용한 저압가열형의 소형진공증착장치 (SVC-700TURBO-TM, SANYU)를 이용하여 크롬을 약 200Å 증착하고, 그 후 진공을 계속 유지하면서 금($2\Phi \times 500L$)을 약 2,000Å 증착하였다. 막두께는 수정진동자 (6MHz, PKG 10, LEYBOLD INFICON)를 이용한 막두께 모니터 (TM-200R, Maxtek)로 측정하고, 증착속도를 클롬의 경우는 $0.5 \sim 1.0\text{Å/s}$ 으로, 금의 경우는 $5.0 \sim 10.0\text{Å/s}$ 의 범위가 되도록 조절하였다. 진공도는 이온진공계이지 (ULVAC GI-TL3)로 측정하였고, $10^{-6}Torr$ 이하를 유지하였다. 증착후, 어닐링 등의 열처리는 실시하지 않았다. 계속해서, cover glass를 접착성의 다이싱테이프 (Adwill D-210, LINTEC)에 붙인 후, 다이싱머신 (A-WD-10A, Tokyo Seimitsu)을 이용하여 다이아몬드커터 (52D-0.1T-40H, Asahi Diamond)로 $0.5mm/s$ 의 속도로 순수를 뿌리면서 $100 \sim 400\mu m$ 의 크기로 잘라서 미소담체를 제작할 수 있었다. 그후, 5분간 다이싱테이프에 UV조사하여 접착성을 UV조사전 $19,600mN/25mm$ (카탈로그값)에서 UV조사후 $250mN/25mm$ 로 약화시켜 담체가 접착테이프에서 쉽게 떨어지도록 하였다. 이 공정에 의하여, 1,000~8,000개 정도의 미소담체를 제작할 수 있었다.

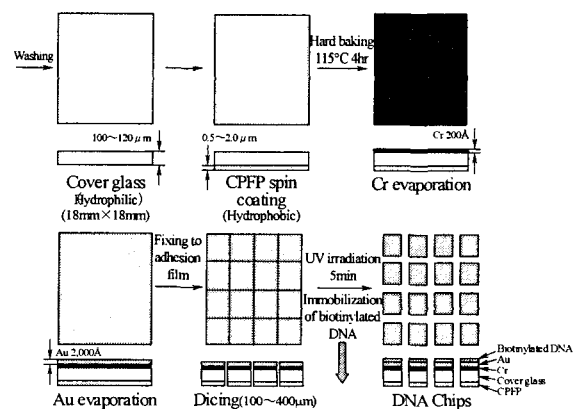


그림 1. DNA칩의 제작 공정.

패턴칩의 제작에 대한 모식도를 그림 2에 나타내었다. 우선, 유리기판 (1.2~1.5mm, 76mm×26mm, S-1225, Matsunami Glass)을 다이아몬드 커터로 3등분한 후, 표면은 초음파세정기를 이용하여 순수, 아세톤, 순수의 순서로 각각 30분간 세정하였다. 그리고, 유리기판이 형광을 가지고 있으므로, 크롬/금/크롬을 차례로 200 Å/2,000 Å/200 Å의 두께로 증착하여 유리기판에 의한 형광의 영향을 방지하였다. 그리고, 유리기판의 한쪽면에 대하여 스펀코팅기를 이용하여 500rpm에서 10초, 1,000~4,000rpm에서 20초간, (C₄F₉)₂N 용제액으로 9wt-%의 농도로 희석시킨 CPFP를 피펫으로 100μL 적하하여 0.5~2.0μm의 두께로 코팅함으로써 소수성으로 처리하였다.

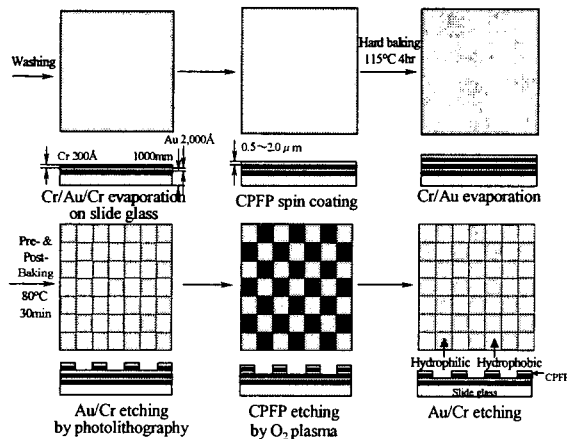


그림 2. 패턴칩의 제작 공정.

다음에 115°C의 항온오븐중에 넣고 4시간 하드 베이킹하였다. 이 위에 크롬과 금을 각각 약 200 Å과 2,000 Å으로 증착한 후, class 10의 클린룸에서 positive형의 포토레지스트인 OFPR-800을 7~8방울 떨어뜨려 스펀코팅 (1H-DXII, MIKASA) (1st:500rpm/10s, slope:10s, 2nd:4000 rpm/20s, slope:5s)하고, 오븐 (DK300, YAMATO SCIENTIFIC)중에서 pre-baking (80°C, 30min)하였다. 그리고, 마스크얼라이너 (MJB3 UV400, Karl Suss)를 이용하여 8초간 노광한 후, 현상액인 NMD-3에 30초간 담구어 현상하고, 초순수로 2번 세정하였다. 계속하여, 질소가스를 불어 건조시켰다. post-baking (80°C, 30min)한 후, 금에칭액 (요화칼륨 40g, 요소 10g, 물 400mL)으로 금을 에칭

하고, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 다음으로, 아세톤 세정으로 포토레지스트를 제거한 후, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 계속해서, 크롬에칭액(수산화나트륨 40g, 페린화칼륨 100g, 물 400mL)으로 크롬을 에칭하고, 현상액 세정과 동일한 과정으로 건조시켰다. 또한, 2×10^{-5} Torr 이하에서 산소플라즈마 (1SCCM, 500V, 이온류 밀도 1.0mA/cm² 이하, RF power 100W) (EIS-200ER, ELIONIX)를 2분간 조사함으로써, CPFP를 에칭시켰다. 다시, 남아 있는 크롬과 금을 모두 에칭시켰다. 이 공정에 의하여 유리기판의 한쪽면에 친수성 및 소수성 부분으로 나누어 수많은 사이트를 제작할 수 있었다.

2.3 무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성 상호작용에 의한 패턴칩에 담체의 고정

패턴칩에 미소담체를 소수성상호작용에 의한 무작위액중자기조직화법으로 고정화하기 위하여 사례에 패턴칩을 놓고, 현탁액 (suspension, 에탄올 90%+순수 10%)중에 넣는다. 그리고, 현탁액에 1500~4000개 정도의 미소담체를 넣고 흔들면 그림 5의 확대도와 같이 중력에 의하여 담체가 가라앉으며, 소수성 상호작용에 의하여 패턴칩과 비오된 DNA가 수식된 담체의 소수성부분끼리가 무작위로 수많은 사이트에서 결합되어 담체가 고정화되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 cover glass의 미소가공 및 패턴칩의 제작

그림 3은 180배로 확대한 제작된 담체의 SEM (S-3500, HITACHI) 이미지로서, 다이싱머신으로 400μm의 크기로 잘라서 제작하였으며, 1,300~4,000개 정도를 제작할 수 있었다.

한편, 포토리소그래픽 및 산소플라즈마 처리하여 에칭한 후의 500μm의 크기의 패턴칩을 그림 4에 나타내었다. 그림 4에서 검정 부분은 금/CPFP로서, 산소플라즈마 처리에 의하여 친수성 처리되어 있다. 또한, 투명하게 보이는 부분은 CPFP만의 부분으로서 소수성이며, 2,600~67,000개 정도의 친·소수성 부분이 격자상 모양으로 되어 있다. 이 패턴칩은 담체군의 무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성상호작용의 응용이 가능할 것으로 생각된다.

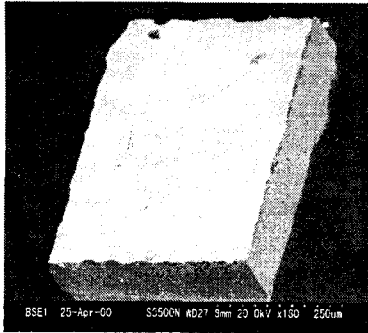


그림 3. 다이싱테이프에 붙이고 다이싱머신으로 400 μ m의 크기로 자른 UV조사후의 담체.

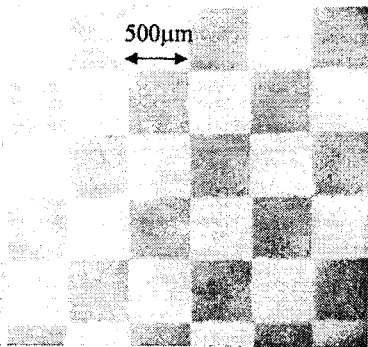


그림 4. 포토리소그래픽 및 산소플라즈마 처리로 에칭한 후의 패턴칩.

3.2 무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성 상호작용에 의한 패턴칩에 담체의 고정

무작위액중자기조직화법을 이용한 소수성 상호작용에 의하여 패턴칩 (500 μ m) 상에 미소담체 (400 μ m) 를 고정하기 위하여, 샬레에 패턴칩을 고정하고 에탄올 90%, 순수 10%의 현탁액을 넣었다. 여기에 1,500~4,000개 정도의 담체를 넣고 흔들면, 수면에 떠있던 담체군이 중력 및 소수성 상호작용에 의하여 그림 5와 같이 패턴칩의 소수성 부분에 고정된다. 그림 5에서 대부분의 담체는 패턴칩과 소수성 부분끼리 접하고 있다.

4. 결론

본 논문에서는 후막용 CPFPP를 이용하여 제작한 소수성막을 갖는 패턴칩에, 다이싱에 의하여 얻은 미소담체를 제작하고, 현탁액중에서 무작위액중자기조직화법을 이용하여 소수성 상호작용에 의하여 임의의 위치에 배치할 수 있었다. 다항목측정용의

고집적형 마이크로어레이형 DNA칩으로서 응용 가능한 기술임을 알았다.

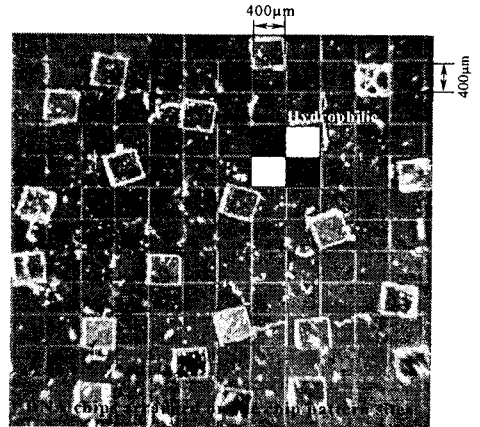


그림 5. 소수성 상호작용에 의하여 패턴칩에 고정된 담체.

감사의 글

“본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R08-2003-000-10312-0) 지원으로 수행되었음.”

참고 문헌

- [1] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science*, **270**, 467, 1995.
- [2] S. P. A. Fodor, R. P. Rava, X. C. Huang, A. C. Pease, C. P. Holmes, C. L. Adams, *Nature*, **364**, 555, 1993.
- [3] E. T. Zellers, S. A. Batterman, M. Han, S. J. Patrasch, *Anal. Chem.*, **67**, 1092, 1995.
- [4] A. E. Bruno, S. Barnard, M. Rouilly, A. Waldner, J. Berger, M. Ehrat, *Anal. Chem.*, **69**, 507, 1997.
- [5] C. A. Browne, D. H. Tarrant, M. S. Olteanu, J. W. Mullens, E. L. Chronister, *Anal. Chem.*, **68**, 2289, 1996.
- [6] A. V. Lemmo, J. T. Fisher, H. M. Geysen, D. J. Rose, *Anal. Chem.*, **69**, 543, 1997.
- [7] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Homes, S. P. A. Fodor, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 5022, 1994.
- [8] M. Chee, R. Yang, E. Hubbell, A. Bernon, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockheart, M. S. Morris, S. P. A. Fodor, *Science*, **274**, 610, 1996.
- [9] G. McGill, J. Labadie, P. Brock, G. Wallraff, T. Nguyen, W. Hinsberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 13555, 1996.