

미세제작된 Interdigitated Array 전극의 Biomedical 응용 Biomedical Application of Microfabricated Interdigitated Array Electrodes

박제균, 김태한, 이상은, 김수현, 김민수, 김인식

LG전자기술원 소자재료연구소

Je-Kyun Park, Tae-Han Kim, Sang Eun Lee, Suhyeon Kim,
Min Soo Kim, and Insik Kim

Devices & Materials Laboratory, LG Electronics Institute of Technology

Abstract - Many biocatalytic reactions in a solution produce or consume ionic species thus resulting in conductivity changes. Living cells are known to be very poor conductors and therefore impedance of an electrode is increased according to adherent growth on the electrode surface. An interdigitated array (IDA) electrode is very useful transducer to measure the impedance change and electrochemical reactions based on the redox recycling system of electroactive species. In this study, IDA gold electrodes were fabricated using conventional thin-film technology and applied to some biomedical areas such as conductometric biosensors and a cell based *in vitro* assay system.

Key words - BioMEMS, Interdigitated array electrodes, Biosensor, Cell chip

1. 서 론

BioMEMS 분야는 기존의 MEMS 기술을 의료 및 생명공학 분야에 있어서 새로운 치료 및 진단 기술 개발 등에 활용하기 위한 시도로서 발전되고 있는 영역이다. 의료분야에서의 MEMS 기술의 응용은 초소형 내시경, 미세 수술기구, DDS (drug delivery system) 로 활용하기 위한 미세캡슐, 바이오센서 개발 분야가 이에 해당된다. 생명공학 응용분야로는 현재 연구가 활발히 진행되고 있는 gene sequencing, functional genomics, 진단 및 스크리닝용 등으로 활용하기 위한 DNA chip과 생체시료 분석용 Lab chip 등이 대표적인 예라 할 수 있다 [1-3].

바이오센서는 생체물질만이 갖는 분자간의 선택적인 반응성을 이용하여 특정 생리활성물질의 농도를 정량 하거나 분석하는 도구로서 이용될 수 있다. 지금까지 생체물질과 기존의 물리, 화학, 광학적 신호변환기를 조합시키기 위한 다양한 연구개발 노력이 진행되어 왔다 [4, 5]. 그러나, 최근의 연구 동향은 기존의 분석도구와는 분명한 차별성을 갖는 제품의 소형화, 편의성, 정확성, 신뢰성 등을

부여하기 위한 노력이 강조되고 있다.

한편, 세포 수준에서 독성물질에 대한 반응 정도를 검출하는 기술은 바이오센서로서의 기능 뿐만 아니라 살아있는 세포의 실시간 반응을 통해 기존의 방법으로는 측정 못하는 세포에 의한 복합적인 생리신호를 검출할 수 있는 장점이 있다 [6]. 따라서, 세포수준에서 생리활성물질을 스크리닝 할 수 있어 궁극적으로는 동물실험 대체용 *in vitro* 스크리닝 기술 개발과 신약 후보물질에 대한 대량검색 (high throughput screening)이 가능하다.

본 연구에서는 미세가공기술로 제작된 interdigitated array (IDA) 전극을 활용하여 바이오센서 및 Cell chip으로의 응용에 대해 고찰하였다. IDA 전극은 손가락 모양의 전극을 미세한 폭으로 중첩시킨 형태의 전극 구조로서 효소반응으로 유발되는 전도도의 변화를 측정하거나, 전극활성물질의 연쇄적인 산화환원반응을 측정하는 바이오센서와 HPLC 검출기 등에 사용될 수 있다 [7-9]. 특히, 반도체 미세가공기술을 이용하여 IDA 전극을 제작하는 경우, 수 마이크로 이하의 선폭을 갖는 IDA 전극을 제작할 수 있고, 소형, 저가로 전극을 대량 생산할 수 있는

장점이 있다.

2. 본 론

2.1 IDA 전극의 바이오센서로의 응용

2.1.1 IDA 전극의 제작

Metal을 증착하기 전에 APM (ammonium hydroxide-hydrogen peroxide) cleaning을 실시하여 기판 (5~Glass)의 표면에 존재하는 organic residue를 제거하였다. Cleaning이 완료된 기판에 DC sputtering 방법으로 Cr (200 Å)을 증착하고, 곧이어 Au (1200 Å)을 증착하였다. 금속이 증착된 기판은 RCA cleaning (아세톤 5분, 메탄올 5분, 증류수 5분의 초음파 세척)을 하고 spin dryer를 사용하여 기판 표면의 물기를 완전히 제거하였다. 다음에 photolithography 공정을 통하여 첫번째 포토 마스크인 IDA 전극 pattern을 형성하였다. 이와 같이 준비된 기판을 wet etching 방법을 이용하여 Au를 etching하고, 이어 Cr을 etching한 다음, PR을 제거하여 IDA 전극을 형성시켰다.

형성된 IDA 전극상의 전극활성영역과 외부회로와 연결하기 위한 pad 부분을 제외한 부위에 passivation 층을 형성하기 위하여 다음과 같이 polyimide (PIX1400, Hitachi)를 사용하였다. 즉, 전극이 형성된 기판을 RCA cleaning한 후, polyimide를 spin coating하고, 300 °C, N₂ 분위기의 furnace에서 60분간 열처리하여 용매를 완전히 제거하는 한편 기계적인 강도를 높게 하였다. 다음 photolithography 공정을 통하여 두번째 포토 마스크인 passivation pattern을 형성한 다음 O₂와 Ar gas를 사용하여 dry etching한 후 PR을 제거하고, 최종적으로 RCA cleaning을 하였다.

IDA 전극의 packaging은 PCB로 제작된 connection pad를 이용하였다. 완성된 IDA 전극은 아세톤과 메탄올로 다시 세척하고 1 M H₂SO₄ 용액속에서 cyclic voltammetry를 반복 수행하여 전기화학적 cleaning 작업을 완료한 후 실험에 사용하였다.

2.1.2 IDA 전극의 전기화학적 특성 분석

일반적인 전기화학실험은 EG&G PAR 273 potentiostat을 사용하여 3전극 시스템으로 진행하였으며, 전극활성물질의 연쇄적인

산화환원반응을 측정하기 위해서는 자체 제작된 Bi-potentiostat (LG Elite)을 사용하여 실험하였다. conductivity 측정에는 Hewlett-Packard 4284A impedance analyzer를 이용하여 IDA 전극의 admittance 값과 phase angle을 측정한 후, conductance 값을 계산하였다.

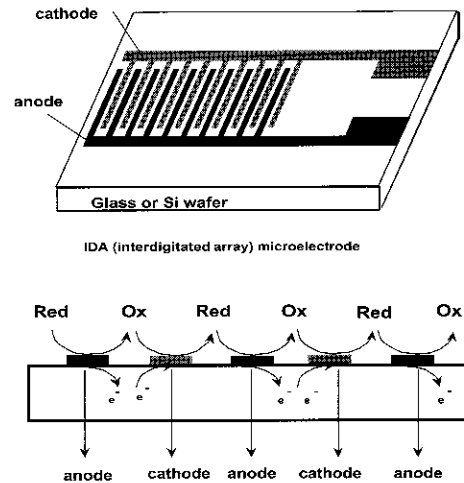


그림 1. IDA 전극을 이용한 전극활성물질의 산화환원 리사이클링 기작의 원리

그림 1에서와 같은 IDA 전극에서 전극 한쪽은 양극 (anode)으로 다른 한쪽은 음극 (cathode)으로 작용시키면 전극상부에서 전극활성물질의 연쇄적인 산화환원반응이 일어나게 된다. 결국 단순히 전극활성물질의 산화 또는 환원반응만을 측정하는 경우보다 이론적으로 2배 이상의 신호증폭 효과를 기대할 수 있다. 예로서 +350 mV가 인가된 IDA 전극의 양극에서 ferrocyanide가 ferricyanide로 산화되고, 산화된 ferricyanide는 -50 mV가 인가된 인접한 음극에서 다시 환원되어 ferrocyanide로 전환된다. 이러한 과정들은 IDA 전극의 각 양극과 음극에서 연속적으로 발생하게 되며 결과적으로 ferrocyanide가 전극상에서 일방적으로 산화되는 반응에 비해 신호의 크기가 증폭된다. 전극신호의 증폭도는 인접한 전극의 선폭 및 전극간 거리 등에 의해 영향을 받게 된다. IDA 전극의 collection efficiency는 anodic 전류와 cathodic 전류의 비로 나타낼 수 있는데 IDA 전극의 선폭과 전극간 거리가 각각 10 μm일 때 계산된 collection efficiency는 46% 이었다. 또한 신호증폭에 직접적으로 관여하는 인자인 증폭 계수 (amplification factor)는 ferrocyanide

농도별 표준 검정곡선의 기울기의 비로서 계산되며 위 실험의 경우 12.56 이었다. 이와 같은 측정방법은 일반적으로 전기화학분석에 있어서 검출한계를 향상시킬 수 있는 장점이 있다.

2.1.3 바이오센서로의 응용

그림 2에 IDA를 이용하여 산화환원 리사이클링 시스템을 이용할 수 있는 전극활성물질의 예를 나타내었다.

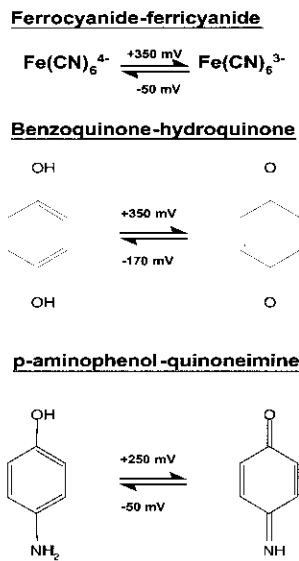


그림 2. 산화환원 리사이클링이 유발되는 대표적 전극활성물질

면역분석법에서 많이 사용되고 있는 alkaline phosphatase의 경우 p-amino-phenyl phosphate를 기질(substrate)로 사용하게 되면 p-aminophenol이 생성되므로 역시 위와 같은 연쇄적인 산화환원반응을 측정할 수 있어 기존 전기화학적 분석법이 갖는 측정감도를 보완 증진할 수 있게 되어, 다양한 면역센서의 개발이 가능하다. 또한, 적절한 시료 분리시스템과 같이 사용하게 되면 신경전달물질인 dopamine, norepinephrine, epinephrine과 같은 catecholamines 류의 정성분석에도 이용할 수 있게 된다.

IDA 전극을 바이오센서로 이용할 수 다른 한 방법은 그림 3과 같은 효소 반응의 산물이 전도도의 변화를 유발하는 경우이다. 즉, glucose, urea, creatinine, D-amino acids 등을 측정할 수 있는 다양한 효소센서의 개발

이 가능하다. 그리고, organophosphates 및 신경가스 등의 경우는 acetylcholinesterase의 저해제로 작용하게 되므로 acetylcholinesterase의 효소활성을 간접적으로 측정함으로써 이들 물질의 정량에도 사용될 수 있다.

Urease를 tetramethoxysilane (TMSO)을 사용한 sol-gel 방식으로 IDA 전극상부에 고정화 시킨 urea 센서의 경우, 그림 4에서와 같이 urea 농도를 0.2-50 mM 까지 측정이 가능하였고, 6.5%의 재현성 및 좋은 센서 보관성이 유지된 바 있다 [10]. 사용된 완충용액은 5 mM imidazole-HCl (pH 7.5)이었고, 측정조건은 IDA 전극 양단에 10 kHz, 10 mV의 교류신호를 인가하고, urea 농도별 정상상태(steady-state)로부터의 admittance 값을 이용하여 얻은 정량곡선이다.

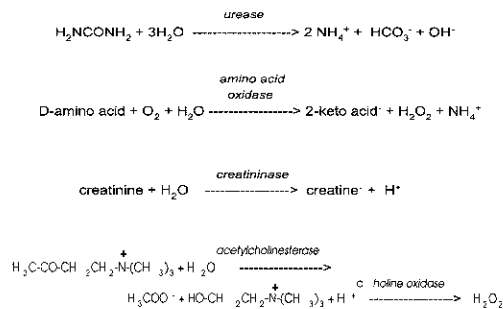


그림 3. 전도도 측정 방식을 이용한 바이오센서에 사용되는 효소 반응 시스템

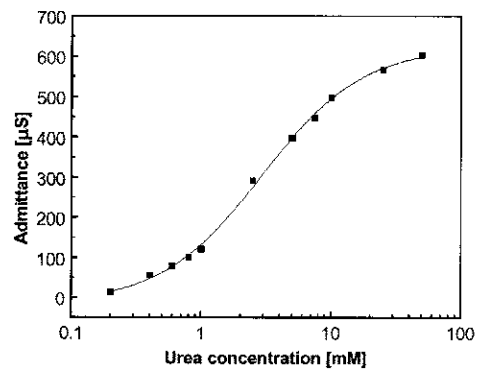


그림 4. Sol-gel 방식의 IDA 요소센서의 응답특성

2.2 IDA 전극을 이용한 Cell chip 개발

2.2.1 세포배양

쥐의 피부암세포주인 B16-F1 melanoma 세포를 American Type Culture Collection

(ATCC)으로부터 분양 받아, 10% fetal bovine serum, 항생제, glutamine이 포함된 DMEM 배지로 조직배양 하였다. 세포가 성장하여 표면에 균일하게 monolayer를 형성한 시점마다 1:10 비율로 계대배양 (subculture)을 하였다.

2.2.2 Cell chip 제작

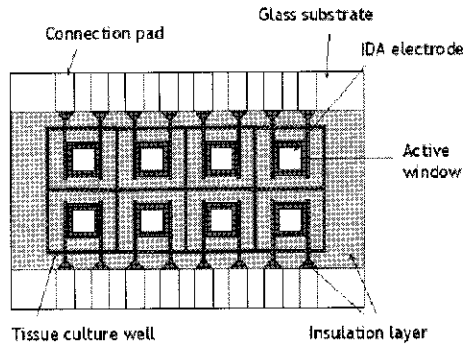


그림 5. 세포배양용기가 장착된 Cell chip 구조

대부분의 동물세포는 미생물과 달리 기질에 의존적으로 붙어 자라며, 또한 세포막의 특성상 절연의 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 동물세포의 특성을 응용하면 동물세포의 성장 및 활성을 전기적으로 측정할 수 있다. Cell chip은 다수의 시료를 동시에 처리할 수 있도록 8개의 well을 갖도록 고안되었고, 각각 well 내의 바닥에는 IDA (10 X 50 μ m, 33 fingers) 급 전극을 형성시켰다. 전기적 측정법과 아울러 기존의 현미경을 이용한 육안 관찰법도 동시에 수행할 수 있도록 투명한 물질인 유리 (Corning glass wafer #7740)를 바닥 기질로 하였다. 그림 5에 Cell chip의 대략적인 구조를 나타내었다.

2.2.3 Impedance 측정 시스템

동물세포가 성장함에 따라 변하는 impedance값을 측정하기 위하여 Cell chip cartridge, lock-in amplifier, 8개의 well을 순차적으로 측정할 수 있도록 스위칭 해주는 scanner 모듈, 그리고 PC로 측정시스템을 구성하였다 (그림 6). 측정방법으로는 비교적 장시간 (약 2-3일)의 측정시간임을 고려하여 배지와 같은 외부환경에 의한 전기적 특성이 변하는 것을 보상하기 위하여 lock-in amplifier의 2개 channel을 이용한 차동 측정

방식을 택하였다. 그림 6에서 보는 바와 같이 1-7번 well은 lock-in amplifier의 A-channel에 연결되고 8번 well은 lock-in amplifier의 B-channel에 연결되며 이를 중개하는 역할을 scanner가 담당한다. 1-7번 well에는 B16-F1 세포를 접종하고, 8번 well에는 배지만을 첨가한 대조군으로 A와 B channel 간의 impedance 값의 차이를 얻을 수 있도록 하였다. PC 프로그램 상으로 1번부터 7번까지 세포성장에 따른 A-channel의 B-channel에 대한 impedance 차이를 연속적으로 모니터링 한 후, 3분간의 resting state를 주었다. 이 resting state에서는 각각의 well에 전압이 가해지지 않게 하여 세포에 전기적인 스트레스를 줄이도록 하였다. 이러한 동작을 반복하면서 초기 접종부터 약 2-3일간의 세포성장에 따른 impedance의 변화를 측정하였다. 이때 측정시 가해진 교류전압은 100 mV이었으며, 주파수는 4 kHz 이었다.

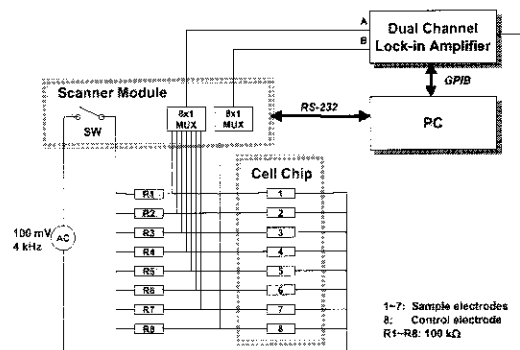


그림 6. Impedance 측정 시스템

2.2.4 Melanoma 세포성장 온라인 모니터링

세포가 분열하고 성장함에 따른 impedance 변화유무를 IDA 전극이 내장된 Cell chip을 이용하여 측정이 가능한지의 여부를 알기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 플라스크 내에서 B16-F1 melanoma 세포를 배양한 후, 트립신으로 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어내서 적정량의 세포를 대조군인 1-4번 well에 접종하고, 5번 well과 대조군인 8번 well에는 배지만을 첨가하였다. 1-5번 well과 8번 well간의 impedance 차이 값을 그림 7에 나타내었다. 그림 7에서 보는 바와 같이 세포가 접종된 1-4번 well은 시간이 흐름에 따라 세포분열이 거듭되어 impedance 값이 증가함을 알 수 있다. 대조군으로 5번 well은 배지만이 첨가되었으므로

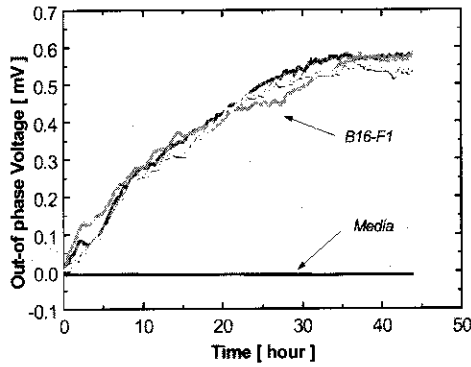


그림 7. B16-F1 세포 배양에 따른 Cell chip impedance 측정값의 변화

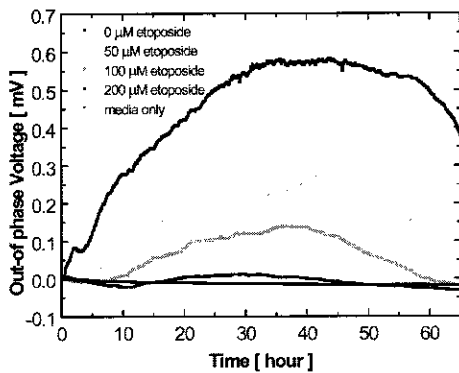


그림 8. B16-F1 세포 배양시 etoposide 첨가 농도에 따른 Cell chip impedance 값의 변화 양상

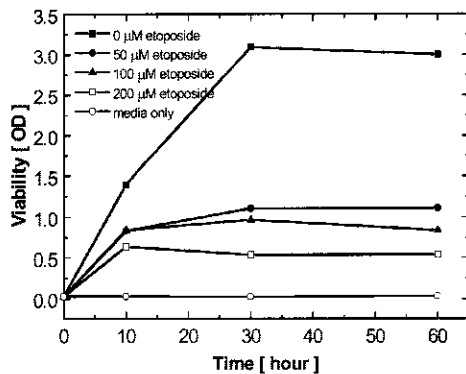


그림 9. Etoposide 첨가농도에 따른 B16-F1 세포의 MTT 분석

역시 배지만이 첨가된 8번 well과 아무런 impedance 차이 값을 나타내지 않으므로 시간의 변화에 상관없이 일정한 값을 나타내게 된다.

이와 같은 결과를 토대로 Cell chip을 약

물검사에 응용하였다. 위에서와 같은 방법으로 1-4번 well에는 세포를 접종하고 5번과 8번 well에는 배지만을 첨가한 후, 항암제로 알려진 etoposide를 농도를 달리하여 1-4번 well에 가하였다 (그림 8). 실험의 결과에서 보는 바와 같이 세포의 성장이 약물 농도에 의해 변화함을 1-4번 곡선의 차이로 확인할 수 있었다.

또한 Cell chip에 의한 impedance 측정을 기존의 방법과 비교하기 위하여 MTT 분석을 Cell chip에서와 같은 조건으로 수행하였다. 이 방법은 세포의 증식정도를 알아보기 위해 쓰이는 대표적인 방법중의 하나로 그 원리는 다음과 같다. 수용성인 연한 노랑색의 tetrazolium salt [3-(4,5-dimethyl- thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT)는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 dehydrogenase에 의해 보라색의 불용성 formazan으로 바뀌는데, 이를 isopropanol이나 DMSO와 같은 용매에 녹여 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 세포의 수나 세포에 미치는 독성정도를 알 수 있다. 세포 접종후 즉시, 세포 배양 10시간, 30시간, 60시간후의 배지에 MTT solution을 최종 농도가 0.5 mg/ml이 되도록 넣어주고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양후에 DMSO에 녹여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 결과를 그림 9에 나타내었다. MTT 분석법에 의해 얻어진 세포성장 곡선과 그림 8에서 얻은 Cell chip 시스템에 의한 impedance 결과를 비교시 세포의 활성화도 패턴이 유사한 경향을 보였다. 따라서, impedance 측정방식의 Cell chip 시스템을 이용하여 동물세포의 활성화도를 측정하는 기존의 off-line 방법을 on-line으로 대체할 수 있는 가능성을 보여 주었다.

3. 결 론

미세 가공 기술을 이용하여 제작된 IDA 전극을 활용하여 전도도 측정방식의 바이오 센서 및 impedance 측정방식의 Cell chip으로의 응용에 대해 고찰하였다. IDA 전극은 기존의 반도체 공정으로서 손쉽게 제작할 수 있고, 대량 제작시 전극의 재현성 확보가 용이하고 소형화 할 수 있으며 낮은 단가로 제작될 수 있는 장점이 있다. IDA 전극을 채용한 Cell chip을 B16-F1 melanoma 세포

배양에 적용한 결과, 세포성장과 impedance 변화량이 상관성을 보였고, 세포의 성장을 저해하는 약물의 투과시 Cell chip의 impedance 변화 역시 기존의 방법과 유사한 결과를 보여 주었다.

참 고 문 헌

- [1] C. S. Effenhauser, "Integrated chip-based microcolumn separation systems," In *Microsystem Technology in Chemistry and Life Sciences* (J. Becker and A. Manz eds.), Springer-Verlag New York, pp. 51-82, 1998.
- [2] S. F. Brown, "Good-bye, Test Tubes. Hello, Labs-on-a-chip," *Fortune*, October 11, 282[C]-282[T], 1999.
- [3] S. M. Reiss, "BioMEMS: a paradigm shift in the making," *Biophotonics International*, 7(4): 40-45, 2000.
- [4] M. P. Byfield and R. A. Abuknesha, "Biochemical aspects of biosensors," *Biosensors & Bioelectronics*, 9: 373-400, 1994.
- [5] R. S. Sethi, "Transducer aspects of biosensors," *Biosensors & Bioelectronics*, 9: 243-264, 1994.
- [6] B. Wolf, M. Brischwein, W. Baumann, R. Ehret, and M. Kraus, "Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCMR)," *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 501-509, 1998.
- [7] D.C. Cullen, R. S. Sethi, and C. R. Rowe, "Multi-analyte miniature conductance biosensor," *Analytica Chimica Acta*, 231: 33-40, 1990.
- [8] R. Hintsche, M. Paeschke, U. Wollenberger, U. Schnakenberg, B. Wagner, and T. Lisek, "Microelectrode arrays and application to biosensing devices," *Biosensors and Bioelectronics*, 9: 697-705, 1994.
- [9] H. Tabei, M. Takahashi, S. Hoshino, O. Niwa, and T. Horiuchi, "Subfemtomole detection of catecholamine with interdigitated array carbon microelectrodes in HPLC," *Anal. Chem.*, 66: 3500-3502, 1994.
- [10] W. Y. Lee, K. S. Lee, T. H. Kim, M. C. Shin, and J. K. Park, "Microfabricated conductometric urea biosensor based on sol-gel immobilized urease," *Electroanalysis*, 12: 78-82, 2000.