

압전 재료의 탄성표면파 특성과 단백질의 고정화

정우석 · 홍철운 · 김기범[†]

전북대학교 공과대학 생체정보공학부
561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14
(2005년 11월 11일 접수, 2006년 1월 20일 채택)

Surface Acoustic Wave Characteristics of Piezoelectric Materials and Protein Immobilization

Woo-Suk Chong, Chul-Un Hong and Gi-Beum Kim[†]

*Division of Bionics and Bioinformatics, College of Engineering, Chonbuk National University,
664-14, Duckjin-dong 1ga, Duckjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea
(Received 11 November 2005; accepted 20 January 2006)*

요 약

본 연구에서는 전기적 결합 계수가 큰 PMN-PT 압전 재료를 사용하여 탄성표면파를 발진시켜 단백질을 검출할 수 있는 새로운 바이오센서로써 이용 가능성을 확인하고자 시도하였다. 실험결과 PMN-PT 압전 재료의 중심 주파수 필터링은 LT 압전 재료보다 우수하였지만, 만족할만한 결과를 얻을 수는 없었다. 또한, 본 연구에서는 위암을 일으키는 mismatched DNA를 검출하기 위한 방법을 개발하고자 하였다. 그 결과 EDC 용액을 사용하여 NTA에 MutS를 고정화하였다. 그러나 Ni(니켈)을 사용하여 MutS를 고정화하여 mismatched DNA를 측정하는 것이 더 효과적인 방법이라 판단된다.

Abstract – In this study, in using a piezoelectric material of $\text{Pb}(\text{Mg}_{1/3}\text{Nb}_{2/3})\text{O}_3\text{-PbTiO}_3$ (PMN-PT), which has a high electromechanical coupling coefficient, we have tried to study about this material can be practically available as a new biosensor to detect protein by using surface acoustic wave (SAW). As the results, the filtering of the center frequency of the PMN-PT substrate is a superior result to that of the LiTaO_3 (LT) substrate, but the result was not completely satisfactory. Also this study attempts to develop a sensing method to detect mismatched DNA in order to diagnose cancer. We could directly immobilize the MutS to the NTA using the EDC solution. But, we immobilized MutS using nickel and it is judged that is more effective method to detect mismatched DNA.

Key words: Surface Acoustic Wave Biosensor, Electro-mechanical Coupling Coefficient, PMN-PT, Protein Immobilization

1. 서 론

바이오센서는 효소, 균 및 생물조직 등을 이용한 계측센서, 생체계의 메커니즘을 모방한 계측시스템 센서, 생체계를 대상으로 하여 계측하는 센서 등을 일컫는 말이다[1, 2]. 이와 같은 바이오센서의 특징으로 센서의 일정한 물질에만 작용하는 반응 특이성, 간편성, 미량성 그리고 측정물질을 분리하지 않고 직접 측정할 수 있다는 장점 때문에 의료, 식품 및 환경 등의 다양한 분야에 응용되고 있다[1, 3-7]. 최근 들어 바이오센서를 이용하여 생체 내에 극 미량 물질의 존재를 찾아내어 생체 물질 정보를 인지하기 위한 연구가 진행 중이다. 그러나 현재 개발되어 있는 바이오센서의 대부분은 단 기능 센서로 한정되어 있어 복잡한 생체 물질 정보를 인식하는 것

이 곤란하다. 그러므로 생체 물질을 분자수준으로 인식하는 것과 종합적인 생체 물질정보로부터 정확한 판단과 미래의 예측까지 가능한 지능화 바이오센서의 개발이 필요하다[8]. 그러므로 본 연구팀에서는 이와 같은 바이오센서를 개발하기 위하여 탄성표면파(surface acoustic wave, SAW)를 이용한 센서를 개발하고자 시도하고 있다. 탄성표면파를 이용한 신개념의 바이오센서는 SAW를 발진하기 위한 미세 전극(inter-digital transducer, IDT)의 주기로 주파수가 결정되어 진다. 발진된 주파수는 센서의 표면상 물질 흡착이 발진 주파수의 변화로 검출되며 주파수 변화는 발진 주파수의 계급에 비례하기 때문에 고주파수화가 용이하다. 이와 같은 SAW를 이용한 방법은 기존의 바이오센서보다 큰 주파수 변화를 얻을 수 있으며 액상과 기상에서 동시에 응용이 가능하고 여진 주파수가 기존의 바이오센서보다 최대 10배 이상 크다. 그러므로 집적성이 용이하여 바이오센서를 소형화로 제작이 가능하고, 실시간 측정이 가

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kgb70@chonbuk.ac.kr

능하며 측정 시료량을 소량화 할 수 있는 장점이 있다[9].

본 연구에서는 탄성표면파를 발진시킬 수 있는 새로운 PMN-PT 압전 재료를 사용하여 SAW 센서로서의 이용 가능성을 확인하고자 시도하였다. 또한, 본 연구에서는 초기 암 진단을 하기 위한 센서를 개발하기 위하여 암을 진단하기 위한 mismatched DNA 검출하기 위한 센서를 개발하기 위하여 표면탄성파(surface acoustic wave, SAW)를 이용하고자 하였다. 그러므로 mismatched DNA를 검출(detection)하기 위하여 QCM 전극을 사용하여 단백질의 고정화(immobilization)를 시도하였다. 기존의 방법은 Ni-NTA를 사용하여 His-Tag이 공유결합(covalent bond)되어 있는 MutS를 Ni-His-Tag 이 선택적으로 결합하도록 하였다. 이와 같은 공정은 수차례의 합성과정을 하여야 하기 때문에 불편하다. 그러나 본 연구에서는 니켈과 His-Tag이 없는 상태에서 NTA와 MutS가 선택적으로 결합하도록 시도하였다. 또한, 기존에는 금 표면에 단백질을 고정화하였으나, 본 연구에서는 금을 사용하지 않고 고분자 박막을 압전기판에 코팅한 후 단백질을 고정화되도록 시도하였다.

2. 실험방법

2-1. SAW 특성평가

SAW 필터의 기본구조는 Fig. 1과 같이 압전기판상에 얇은 금속 전극으로 형성된 2개의 interdigital transducer(IDT)로 구성되어 있다. 이중 한 개의 IDT에서 인가된 전압에 의해 표면 탄성파를 발생시키는데 흔히 이것을 입력 IDT 또는 송신기(transmitter)라고 한다. 이때 발생된 표면 탄성파는 기판 표면의 free surface를 따라 적절한 주파수로 팽창과 압축으로 두 번째 IDT에 전달되어 역 압전 효과에 의해 전기적 신호로 변환된다. 이 두 번째 IDT를 출력 IDT 또는 수신기(receiver)라고 한다. 주파수는 IDT의 거리(ω_s), IDT의 폭(ω_p), 파장(λ) 그리고 SAW의 속도(v_s)의 관계에 의하여 결정되며 $f = v_s/\lambda$, $\lambda = 2(\omega_s + \omega_p)$ 으로 나타낼 수 있다. 본 연구에서는 5" 크기의 PMN-PT, LT 웨이퍼 위에 IDT 전극을 제작하였으며, 제작된 센서들의 성능을 평가하기 위하여 발진 주파수법을 이용하였다.

실험 장치는 Fig. 2와 같이 발진주파수 시스템을 구성하였으며, SAW의 구조를 관찰하기 위하여 probe station을 사용하였고, 실험에 사용된 센서는 7종류이며, 각각의 특성은 Table 1에 나타내었다. 본 연구에서 사용되어진 PMN-PT 압전 재료는 Bridgman 법을 이용하여 결정을 성장시켰으며 성장되어진 결정은 센서를 제작할 수 있는 크기로 절단하여 웨이퍼를 제작하였다. 4"크기의 PMN-PT 웨이퍼 위에 IDT 전극을 제작하기 위하여 photolithography 법을 이용하여 제작하였다. IDT 전극은 알루미늄으로 제작하였으며 두께는

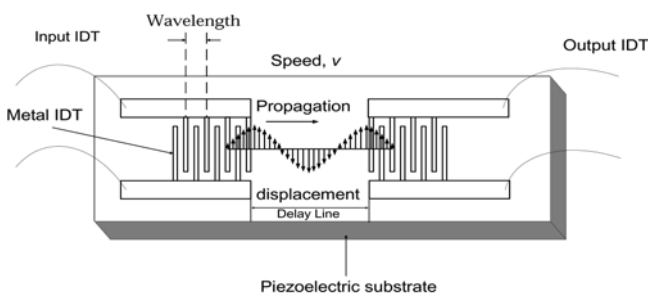


Fig. 1. SAW interdigital transducer (IDT).

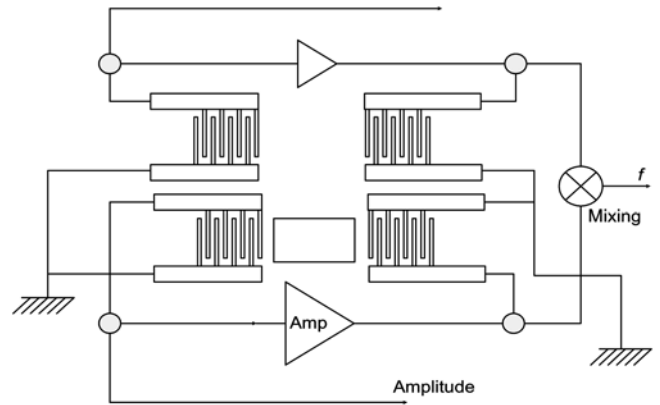


Fig. 2. Oscillation circuit system for detecting frequency.

Table 1. Types of SAW sensor

	Cutting degree and Piezoelectric material	Wave length (μm)
Type 1	36°Y-X cut LiTaO ₃	12
Type 2	36°Y-X cut LiTaO ₃	16
Type 3	42°Y-X cut LiTaO ₃	16
Type 4	42°Y-X cut LiTaO ₃	80
Type 5	42°Y-X cut LiTaO ₃	40
Type 6	PMN-PT	80
Type 7	PMN-PT	40

3,000 Å으로 하였다. 또한, PMN-PT 압전 기판 재료의 특성을 비교하기 위하여 LiTaO₃(NT) 압전 기판을 사용하여 센서를 제작하였다.

2-2. 단백질 고정화

QCM 전극의 금 표면에 NTA를 고정화하기 위하여 자기조립단분자층 형성 방법(self assembled monolayer process)을 이용하였다. NTA(nitrilotriacetic acid) 수용액을 10 ml의 시험관에 5 ml를 주입하고 QCM(quartz crystal microbalance) 전극을 담갔다. QCM 전극이 담겨 있는 NTA 수용액 vial을 50 °C의 배양기에서 3시간 이상 보관하였다. 3시간이 경과 후 QCM 전극을 빼내어 대기 중에서 30분 정도 NTA의 고정화를 안정화시켰다. 안정화 이후 증류수를 사용하여 세척하고 수분을 제거하였다. MutS는 NTA에 직접 고정화가 어렵기 때문에 EDC(1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide) 용액을 사용하여 NTA 표면에 고정화하였다. EDC를 NTA에 고정화하기 위하여 10 mM, pH 7의 PBS(phosphat buffer solution)를 사용하여 20 mM의 EDC 용액을 제조하였다. 제조 방법은 PBS 5 ml, 19.17 mg을 용해시켰다. 제조된 EDC 용액에 NTA가 고정화된 전극을 담그고 상온에서 4시간 이상 정치시켰다. NTA-EDC가 고정화되어 있는 전극에 MutS 단백질을 고정하기 위하여 전극을 quartz crystal analyzer에 연결하고 초기 진동 주파수(Initial frequency)를 측정한 이후 micropipet을 사용하여 1 ml의 MutS 단백질을 테스트 cell에 주입 후 시간의 경과에 따라 진동 주파수의 변화를 측정하였다. 실험은 진동 주파수의 변화가 거의 없는 상태가 될 때까지 실시하였다.

2-3. PMMA 코팅

QCM 전극에 PMMA 고분자를 코팅하기 위하여 PMMA를 80 °C

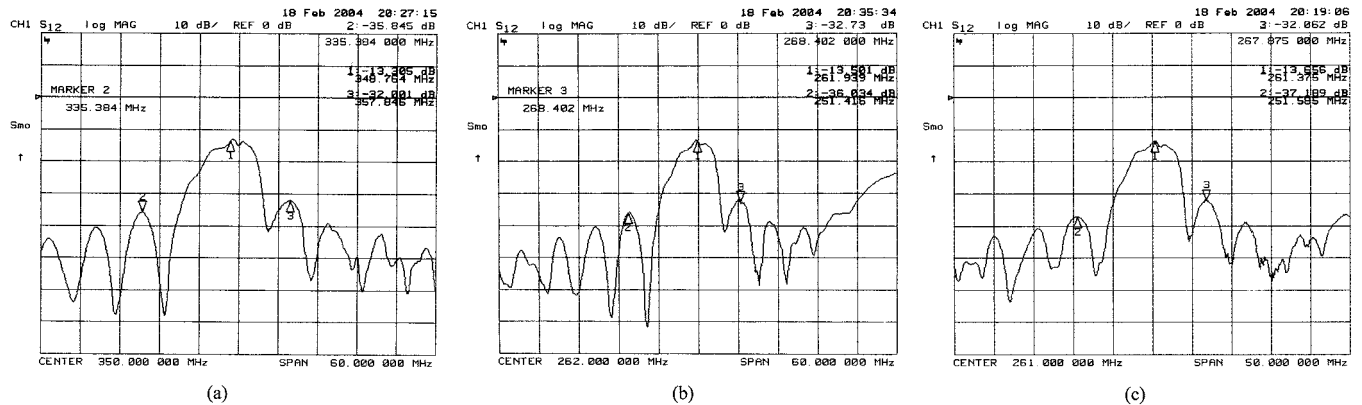


Fig. 3. Frequency responses in LiTaO₃ (LT) sensor without an absorber for input and output probes. (a) Type 1, (b) Type 2, (c) Type 3.

의 2-ethoxyethyl acetate로 용해시켜 용액상태를 만든 후 spin coater를 사용하여 압전기판에 코팅하였다. 코팅 후 180 °C 드라이 오븐에서 2시간 건조한 후 2.2 단백질 고정화 방법과 동일하게 실시하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3-1. SAW 특성평가

Fig. 3은 LiTaO₃(LT) 압전기판을 사용하여 제작한 센서들의 주파수 응답특성을 측정한 결과로 Fig. 3(a)는 type 1, Fig. 3(b)는 type 2 그리고 Fig. 3(c)는 type 3의 주파수 응답을 나타낸 그림이다. 중심주파수를 측정한 결과 type 1은 348.764, type 2는 261.939 그리고 type 3은 261.375 MHz를 나타내었다. 그러나 각각의 그림에서 확인할 수 있었던 사실은 중심주파수와 주변 주파수들의 주파수 응답특성을 비교하였을 때, 3종류(type 1~3)의 센서에서는 중심주파수를 제외한 다른 주변 주파수를 필터링 효과가 만족할 만큼 좋지 않았다.

Fig. 4는 LT 압전 기판과 PMN-PT 압전 기판을 사용하여 제작한 SAW 센서의 주파수 응답 특성을 나타낸 결과이다. 그림에서 파장은 40, 80 μm 그리고 속도는 2,336 m/sec로 하였을 때 결과이다. 그림에서 알 수 있듯이 50, 100 MHz 일 때 가장 큰 진폭을 보이며 이는 이 주파수가 중심주파수임을 나타낸다. 중심주파수를 중심으로 주변 주파수들의 진폭 크기를 비교하였을 때 앞의 실험 결과와는 다르게 중심주파수 주위의 주변 주파수에 대한 필터링 효과가 LT 기판을 사용할 때보다 훨씬 향상된 결과를 나타내었다. 그러나 본 연구에서 원하는 주파수 필터링 효과는 나타나지 않았다. 그 이유는 IDT 전극 패턴 설계에 문제점이 있을 것이라 판단된다. 입력 단자를 통하여 전달되어진 파는 출력단자 방향과 입력단자의 뒤쪽 방향으로 전달되는 표면탄성파가 형성된다. 이때 반대방향으로 전달된 파가 구부러져 있는 입력단자에 의하여 반사되어 다시 출력단자 방향으로 전달되는 반사파가 발생하였기 때문이라 판단된다. 이와 같이 형성된 반사파는 출력단자 방향으로 전달되는 표면탄성파와 중첩이 되어 주파수 필터링이 좋지 않은 결과가 나타난 것으로 판단된다. 그러나 가장 중요한 것은 PMN-PT 기판의 전기기계 결합계수는 0.91, 기존의 LT 기판은 0.02이며 PZT 기판은 0.7(F/m)로 다른 기판 재료들보다 우수함을 확인할 수 있었다.

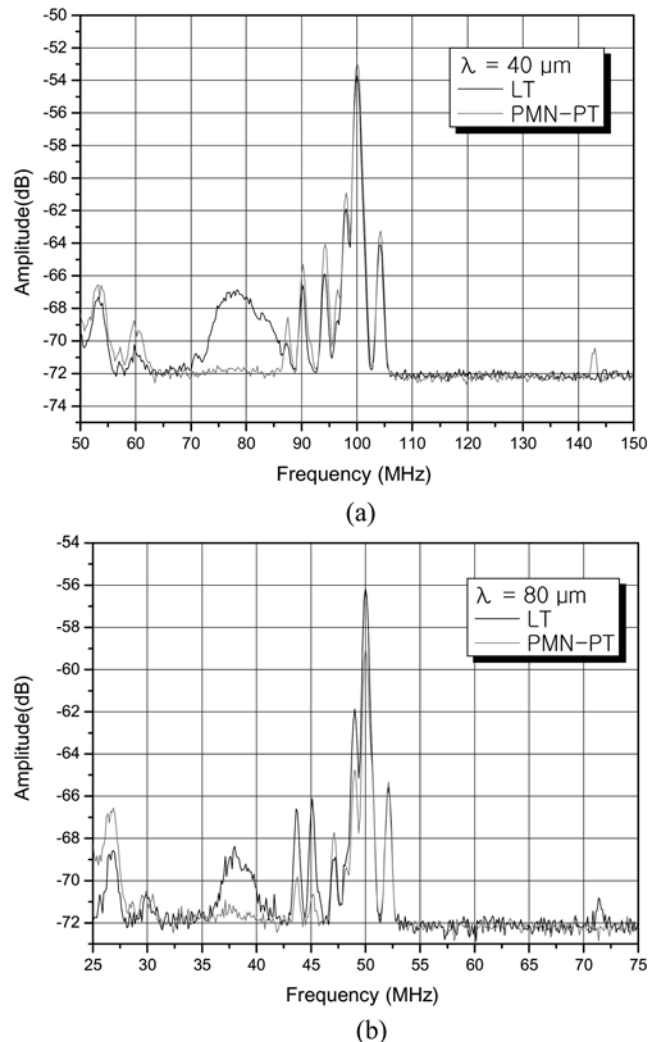


Fig. 4. Frequency responses of SAW sensors fabricated with LT and PMN-PT piezoelectric substrates. (a) Type 4 and 6, (b) Type 5 and 7.

금 표면에 NTA-MutS 단백질을 고정화한 실험을 한 결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. Fig. 5는 시간의 변화에 따른 진동주파수의 변화와 NTA-EDC에 고정화되는 MutS 단백질의 단위 면

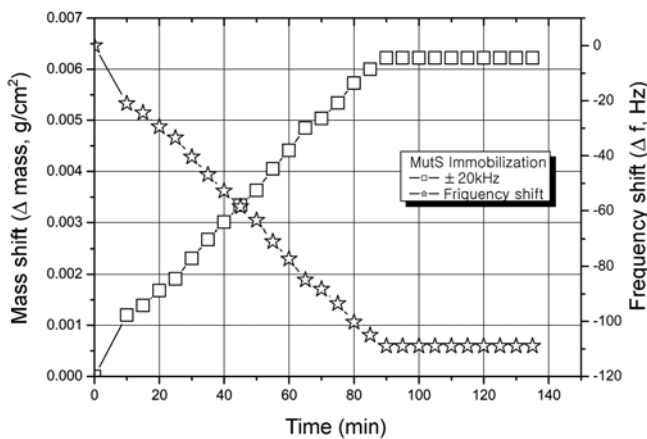


Fig. 5. The results from the changes in the vibration frequency for the passage of time, and the mass changes of the MutS protein.

적당 질량변화를 측정한 결과이다. 실험시간이 90분 경과 후 진동 주파수의 변화가 없어 실험을 종결하였다. 실험결과 시간의 변화에 따라 진동 주파수는 감소하는 경향을 보이고 있으며 MutS의 질량 변화는 증가하는 경향임을 알 수 있었다. 이와 같은 이유는 MutS가 NTA-EDC 표면에 화학적 결합을 하여 질량의 변화가 증가하여 진동 주파수가 감소하기 때문이다. 실험결과 90분 동안 MutS의 고정화 질량을 측정된 결과 0.00622 g/cm^2 가 고정화됨을 확인할 수 있었다. 그러나 실제 QCM 전극에 고정화되는 질량을 계산하였을 때 전극의 면적이 0.196 cm^2 이므로 실제 질량은 0.00122 g 의 MutS가 고정화됨을 확인할 수 있었다.

Fig. 6은 시간의 변화에 따른 고정화 진행속도를 측정된 결과 1차 함수로 나타낼 수 있었다. 이와 같은 결과는 NTA에 MutS를 고정화하는 시간을 예측할 수 있으며 MutS 단백질의 고정화를 실험에 의하여 본 연구팀이 계획하였던 single straight DNA를 MutS 단백질 대신 고정화시킬 수 있을 것이라 판단된다.

Fig. 7은 금 표면에서의 단백질 고정화 실험결과이다. 고정화 실험결과 금 표면에 NTA를 고정화하고 다시 NTA 표면에 MutS를 고정화한 결과 $4.5 \mu\text{g/cm}^2$ 의 MutS가 고정화되었다. 그러나 NTA

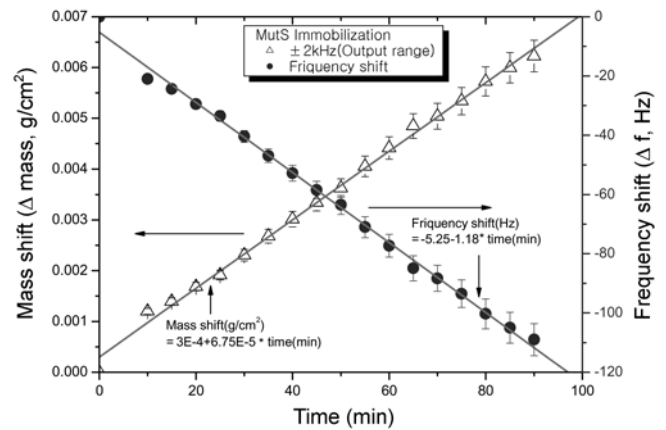


Fig. 6. The results of the immobilization speed for the passage of times.

표면에 니켈을 고정화하고 니켈에 MutS를 고정화한 결과 $11 \mu\text{g/cm}^2$ 의 MutS가 고정화되었다. 이와 같은 실험결과 니켈을 사용하지 않고 MutS를 고정화 할 수 있음을 확인할 수 있었으나, MutS의 고정화 되는 양이 적기 때문에 mismatched DNA를 검출하기 위한 효과적인 방법이 아님을 확인할 수 있었다. 그러나 니켈을 사용하여 MutS를 고정하는 방법은 mismatched DNA를 검출하기 위한 MutS의 양이 많기 때문에 효과적인 방법이라 판단된다.

Fig. 8과 9는 금을 사용하지 않고 PMMA 고분자 박막을 압전기 판에 코팅한 후 단백질을 고정화한 결과이다. 실험결과 PMMA 고분자 박막에 직접 MutS를 고정화한 결과 $4.9 \mu\text{g/cm}^2$ 의 MutS가 고정화되었음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 실험결과는 앞의 실험결과보다는 간단한 실험과정을 통하여 mismatched DNA를 검출하기 위한 MutS를 고정화할 수 있으나 PMMA 박막에 고정화 MutS의 방향성이 일정하지 않기 때문에 효과적인 mismatched DNA 검출이 가능하지 않다고 판단된다. 그러나 PMMA 박막표면에 NTA를 고정화하고 MutS를 고정화하였을 때 $3.5 \mu\text{g/cm}^2$ 의 MutS가 고정화되었음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 실험 결과는 금을 사용하였을 때 보다는 적은 양의 MutS가 고정화되지만, 금을 사용하지 않고 고분자 박막에 단백질을 고정화할 수 있음을 확인할 수 있었다.

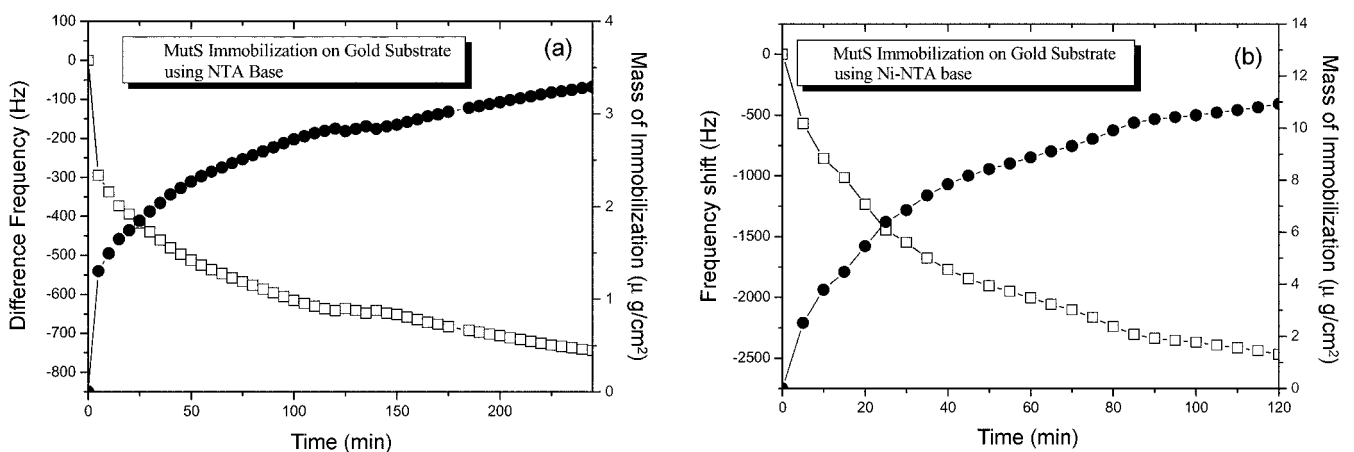


Fig. 7. The results from the changes in the vibration frequency for the passage of time, and the mass changes of the MutS protein on the gold substrate. (a) NTA Substrate, (b) Ni-NTA Substrate.

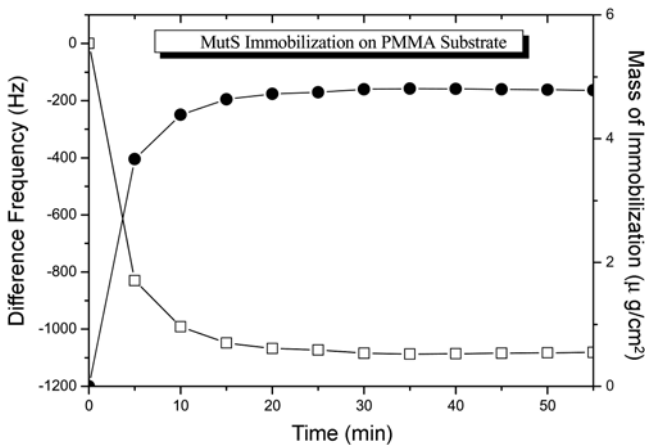


Fig. 8. The results from the changes in the vibration frequency for the passage of time, and the mass changes of the MutS protein on the PMMA substrate.

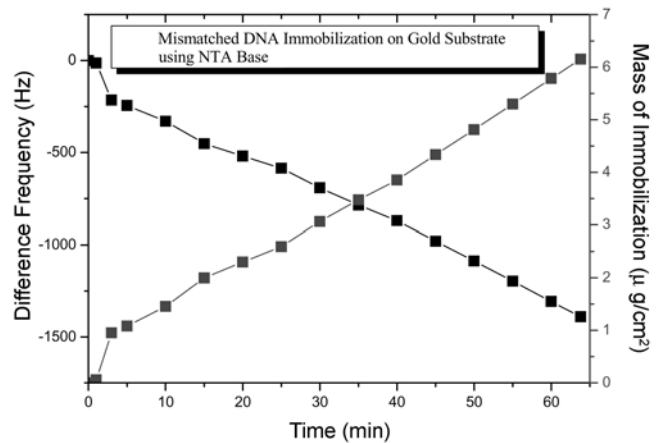


Fig. 11. The results from the changes in the vibration frequency for the passage of time, and the mass changes of the mismatched DNA on the gold substrate-MutS-NTA surface.

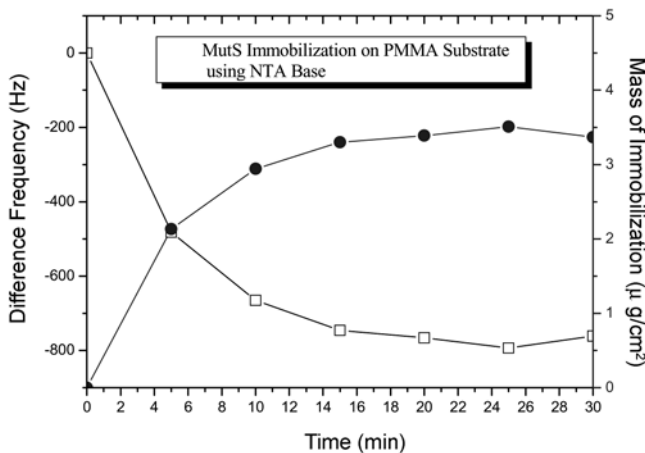


Fig. 9. The results from the changes in the vibration frequency for the passage of time, and the mass changes of the MutS protein on the PMMA substrate-NTA surface.

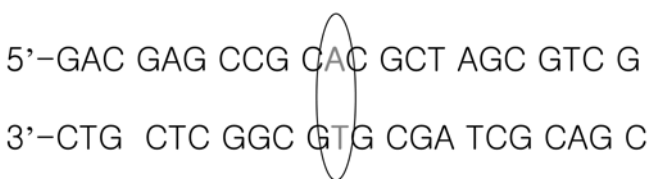


Fig. 10. Normal DNA structure.

Fig. 11은 금 표면에 MutS-NTA를 고정화한 후 mismatched DNA의 고정화 정도를 측정한 결과이다. 실험에 사용된 mismatched DNA는 Fig. 10과 같은 구조의 DNA를 사용하였다. Fig. 10은 정상적인 DNA 구조이지만 붉은색으로 표시된 염기(A(Adenine)-T(Thymine))구조에서 A를 G(Guanine)으로 변형을 시켜 mismatched DNA를 제조하여 사용하였다. 실험결과 MutS에 고정되는 mismatched DNA는 $6.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 고정화되었다. 그러나 위암을 일으키는 mismatched DNA를 측정하기 위해서는 더 많은 양의 DNA가 고정화되어야 하

지만, 본 연구에서 시도되었던 방법은 적절한 방법이 될 수는 없다. 그러므로 측정이 가능한 범위의 DNA를 고정화하기 위해서는 니켈을 사용하여 MutS를 고정하는 방법이 더 효과적인 방법이라 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 PMN-PT 기판을 사용하였을 때 중심주파수에 대한 주파수 필터링은 NT 기판을 사용하였을 때보다 우수하였다. 그러나 본 연구에서 원하였던 주파수 필터링 효과는 얻지 못하였다. 그 이유는 IDT 전극 패턴의 설계에 있어서 문제점이 있을 것이라 판단된다. 그러나 PMN-PT 기판의 전기기계결합계수가 우수하므로 주파수 필터링을 증가시키기 위한 새로운 IDT 전극 설계가 이루어진다면 SAW 센서로 활용이 가능하리라 판단된다. 또한, 본 연구를 통하여 우리는 MutS를 EDC 용액을 촉매제로 사용하여 NTA에 직접 고정화할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통하여 mismatched DNA를 검출할 수 있을 것이라 판단된다. 그러나 니켈을 사용하여 MutS를 고정화하여 mismatched DNA를 측정하는 것이 더 효과적인 방법이라 판단된다.

감 사

본 연구는 보건복지부 주관 신개념바이오/피지오 센서기술연구센터 지원에 의해 이루어진 것입니다(02-PJ3-PG6-EV05-0001).

참고문헌

1. Wolfbeis, O. S., *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, 1, CRC Press, Boca Ration, FL(1991).
2. Hughes, R., Ricco, A., Butler, M. and Martin, S., "Chemical Microsensors," *Science*, **254**, 74-80(1991).
3. Scller, F. W., Schnbertm, F. and Fedrowits, T., *Frontiers in Biosensors*, vol. and, Birkhauser, Berlin(1996).
4. Eggins, B. R., *Biosensors: an Introduction*, John Wiley & Sons

- and B. G. Teubner Publishers, Stuttgart(1996).
5. Mastrangelo, C. H., "Adhesion-Related Failure Mechanisms in Micromechanical Devices," *Trib. Lett.*, **3**, 223(1997).
6. Janata, J., Josowicz, M., Vanysek, P. and DeVaney, D. M., "Chemical Sensors," *Anal. Chem.*, **70**, 179R-208R(1998).
7. Rogers, K. R., Biosensors technology for environmental measurement. In: Meyers, R. A., editor, Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation, John Wiley & Sons, New York(1998).
8. Kim, G. B., Chong, W. S., Kwon, T. K., Hohkawa, K., Hong, C. U. and Kim, N. G., "Basic Study to Develop Biosensors Using Surface Acoustic Wave," *JJAP*, **44**(4B), 2868-2873(2005).
9. Thompson, M. and Stone, D. C., "Surface-launched Acoustic Wave Sensors," John Wiley & Sons, New York(1997).