

# 나노간극 구동기를 이용한 나노기계적 단백질 검출기

이 원 철\* · 조 영 호†

(2004년 8월 12일 접수, 2004년 10월 25일 심사완료)

## Nanomechanical Protein Detectors Using Electrothermal Nano-gap Actuators

Won Chul Lee and Young-Ho Cho

**Key Words :** Nanomechanical Protein Detector(나노기계적 단백질 검출기), Protein Stiffness(단백질 강성), Nano-gap Actuator(나노간극 구동기)

### Abstract

This paper presents a new method and an associated device, capable of detecting protein presence and size from the shift of the mechanical stiffness changing points due to the presence and size of proteins in a nano-gap actuator. Compared to the conventional resonant detection method, the present nanomechanical stiffness detection method shows higher precision for protein detection. The present method also offers simple and inexpensive protein detection devices by removing labeling process and optical components. We design and fabricate the nanomechanical protein detector using an electrothermal actuator with a nano-gap. In the experimental study, we measure the stiffness changing points and their coordinate shift from the devices with and without target proteins. The fabricated device detects the protein presence and the protein size of  $14.0 \pm 7.4 \text{ nm}$  based on the coordinate shift of stiffness changing points. We experimentally verify the protein presence and size detection capability of the nanomechanical protein detector for applications to high-precision biomolecule detection.

### 1. 서 론

최근 생물학적 물질 검출에 근거한 분석 및 진단 분야<sup>(1)</sup>에서 고정도 단백질 검출기에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 종래의 단백질 검출기는 기계적 공진,<sup>(2,3)</sup> 전기화학<sup>(4)</sup> 및 광학<sup>(5,6)</sup> 방식을 이용해 왔다. 이 중 기계적 방식은 전기화학적 및 광학적 방식에 비하여, 측정을 위한 효소나 형광 염료를 부착하는 공정 및 광학적 측정장치가 필요하지 않으므로 간단하고 값싸다는 장점이 있다. 그러나 종래 기계적 공진 방식은 질량에 의한 동적 구조물의 공진 주파수 변화를 이용하는 방식으로, 단백질과 같은 미세질량의 물질을 측정하는

경우 정밀도의 한계가 있다. 본 논문에서는 나노간극을 가진 구동기를 이용하여 미세물질의 탄성에 의한 구조물의 탄성변화를 검출함으로써 미세물질의 존재와 크기를 고정밀도로 측정할 수 있는 새로운 방법과 소자를 제안한다.

본 나노기계적 단백질 검출방식은 단백질 등 미세물질이 질량은 극히 작으나 비교적 큰 강성을 가지므로 타 방식에 비해 매우 우수한 정밀도를 얻을 수 있다. 즉, 질량이  $150 \text{ kDa}$  이고 강성이  $5 \times 10^{-3} \text{ N/m}$  인 단일분자 단백질<sup>(7)</sup>을 길이, 높이, 폭이 각각  $100 \mu\text{m}$ ,  $3 \mu\text{m}$ ,  $5 \mu\text{m}$  인 실리콘 외팔보(질량:  $3.5 \times 10^{-12} \text{ kg}$ , 강성:  $6.4 \text{ N/m}$ )를 이용하여 측정하는 경우, 단백질 분자와 실리콘 보의 강성비는  $7.8 \times 10^{-4}$  이고 질량비는  $7.1 \times 10^{-11}$  이므로, 단백질의 강성을 이용하는 본 방식은 질량을 이용하는 종래 기계적 공진 방식에 비하여 정밀도가  $10^7$  배 향상될 수 있다.

Fig. 1 은 제안하는 나노기계적 단백질 검출기의 간단한 모델이다. 본 검출기는 구동기, 스프링,

† 책임저자, 회원, 한국과학기술원 바이오시스템학과 및 기계공학과, 디지털나노구동연구단

E-mail : nanosys@kaist.ac.kr

TEL : (042)869-8691 FAX : (042)869-8690

\* 한국과학기술원 바이오시스템학과, 디지털나노구동연구단

나노간극으로 이루어져 있고, 나노간극 표면에 검출대상 단백질(target protein)과의 선택적 반응을 위한 리셉터(receptor)가 고정되어 있다. Fig. 2 와 Fig. 3 은 나노간극 구동기를 이용한 나노기계적 단백질 검출기의 원리를 보여준다. Fig. 2 의 push-bar( $m_2$ )를  $x_2$  방향으로 구동하면 리셉터 혹은 검출대상 단백질과 접촉하게 된다. 접촉이 일어나면 리셉터 혹은 특정 단백질이 부가 스프링(Fig. 1 의  $k_{rp}$ )으로 작용하므로, Fig. 3 과 같이 구동 입력( $x_1$ )과 push-bar 의 이동거리( $x_2$ )의 관계에서 기울기가 변화하게 된다. 검출대상 단백질이 있을 경우에는 기울기 변화점까지의 자유거리(free distance)가 감소하므로, 강성변화점(Fig. 3 의  $P$ )의 좌표변화로부터 단백질의 유무와 검출대상 단백질의 크기를 측정할 수 있다.

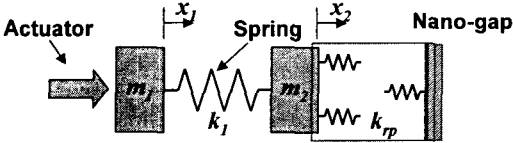


Fig. 1 Simplified model of the nanomechanical protein detectors

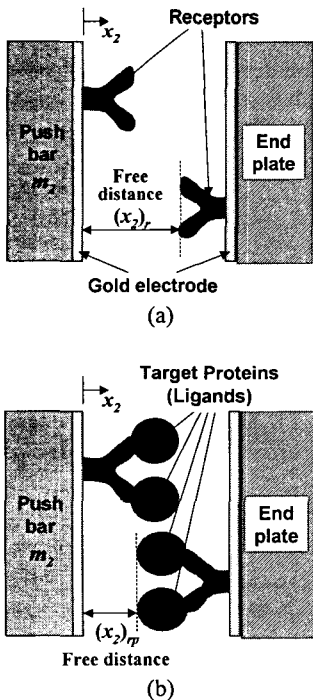


Fig. 2 Nano-gap of the nanomechanical protein detector: (a) without target proteins; (b) with target proteins

2. 이론적 해석 및 설계

나노기계적 단백질 검출기는 Fig. 4 와 Table 1 과 같이 설계하였으며, push-bar 이동을 위한 구동기는 버퍼 용액 내에서 작동이 가능하도록 전기열(Electrothermal) 방식의 구동기를 사용하였다. 나노간극( $g_n$ )은 Fig. 5 에서 보이는 바와 같이, 소자 제작시 push-bar( $m_2$ )와 최종단(end plate) 사이에 비교적 넓은 초기간극( $g_i$ )을 형성한 후, 제작 직후 최종단(end plate)을 스톱퍼(stopper)까지 밀어서 붙임으로써 나노간극을 형성한다.

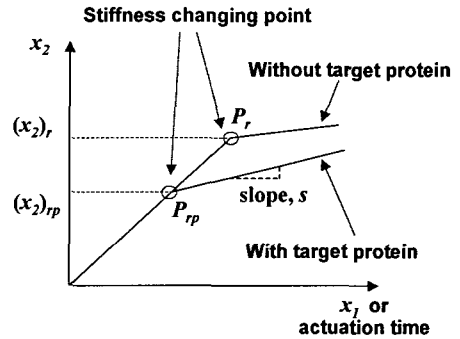


Fig. 3 Relationship between an input actuation,  $x_1$ , and a nano-gap reduction,  $x_2$ , in two cases (without/with target proteins)

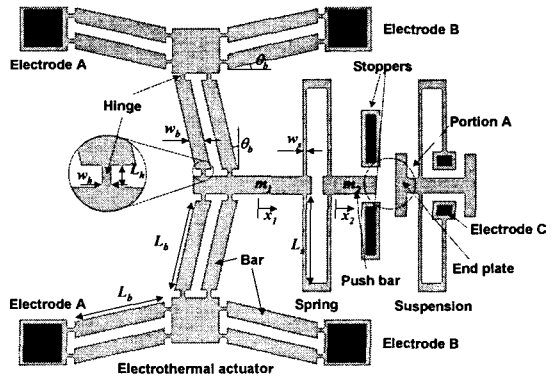


Fig. 4 Top view of the nanomechanical protein detector.

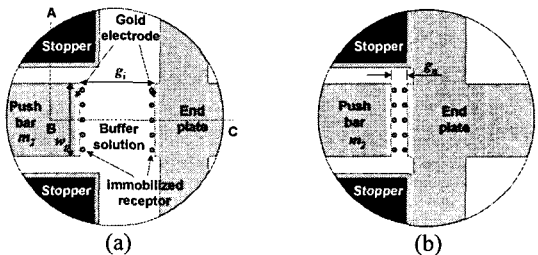


Fig. 5 Enlarged view of the Portion A in Fig. 4: (a) initial gap,  $g_i$ , after fabrication; (b) nano-gap,  $g_n$ , after attaching the end plate

**Table 1** Dimension of the fabricated device

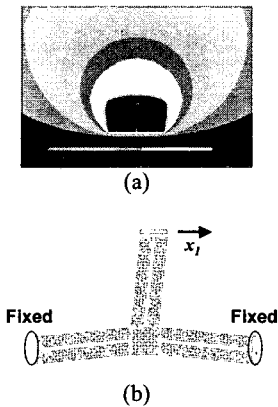
Components or Parts*	Dimension
Structure thickness, $t$	$5\mu\text{m}$
Bar length, $L_b$ , $\times$ Bar width, $w_b$	$220\mu\text{m} \times 28\mu\text{m}$
Bar angle, $\theta_b$	$6^\circ$
Hinge length, $L_h$ , $\times$ Hinge width, $w_h$	$10.0\mu\text{m} \times 4.0\mu\text{m}$
Spring length, $L_s$ , $\times$ Spring width, $w_s$	$200\mu\text{m} \times 3.2\mu\text{m}$
Push-bar width, $w_p$	$10.0\mu\text{m}$
Initial gap, $g_i$	$7.0\mu\text{m}$
Nano-gap, $g_n$	$150\text{nm}$

\*Geometry is shown in Figs.4 and 5.

2.1 전기열 방식 구동기

전기열 방식 구동기의 평면도는 Fig. 4 에 나타내었다. 전극 A 에서 B 로 전류를 흘리면 구동기 막대(bar)에 열이 발생된다. 이 열에 의해 인장된 구동기 막대(bar)가 구동기의 힌지(hinge)를 변형시켜, 구동기 출력단( $m_1$ )을  $x_1$ -방향으로 이동시킨다.

출력 구동거리를 예측하기 위하여, 전기열 방식 구동기를 유한요소법으로 해석하였으며, Fig. 6 에 도시한 바와 같이 2 차원 전기-열 해석과 2 차원 열-구조 해석을 병행하였다. 구동기 막대 단면의 2 차원 전기-열 해석[Fig. 6(a)]을 통해 15.6mA 의 전류가 전극 A 와 B 사이에 인가될 때 구동기 막대 단면의 온도가  $29.6^\circ\text{C}$  상승하였으며, 구동기 구조의 2 차원 열-구조 해석[Fig. 6(b)]에서는 구동기 막대의 온도가  $29.6^\circ\text{C}$  상승할 때 전체 구동기가  $699\text{nm}$  의 구동을 출력함에 예측되었다. 이러한 예상 구동출력은 제작된 나노간극  $150\text{nm}$  에 비해 충분히 크다는 것을 확인하였다.



**Fig. 6** Numerical analysis of the electrothermal actuator: (a) 2D electrothermal bar analysis; (b) 2D thermomechanical actuator analysis

2.2 나노간극을 이용한 push-bar 이동거리 측정  
push-bar 이동거리( $x_2$ )는 나노간극의 임피던스 변화를 이용하여 측정되며, Fig. 7 에서 나노간극의 확대도와 등가전자 회로를 보여준다. 먼저 Fig. 7(a)에서 나노간극 내 버퍼 용액의 임피던스( $Z_g$ )는 다음과 같이 표시된다:

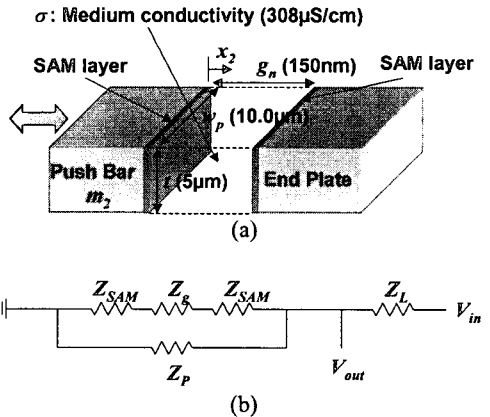
$$Z_g = \frac{g_n - x_2}{\sigma w_p t} \tag{1}$$

식 (1)에서  $g_n$ ,  $\sigma$ ,  $w_p$ ,  $t$  는 각각 나노간극, 버퍼 용액의 전도도, push-bar 의 폭, 구조물의 두께를 의미한다. Push-bar 가 이동할 경우, push-bar 와 최종 단 사이에 있는 버퍼 용액의 두께( $g_n - x_2$ )가 변화하고, 따라서 수식 (1)에서 버퍼 용액의 임피던스가 변화하게 된다. 이 임피던스는 Fig. 7(b)와 같은 전기적 모델을 이용하여 측정할 수 있으며, 입력 전압( $V_{in}$ )이 공급될 때 출력 전압( $V_{out}$ )은 다음과 같이 표시된다:

$$V_{out} = \frac{V_{in}}{1 + \frac{Z_b}{Z_g + 2Z_{SAM}} + \frac{Z_L}{Z_p}} \tag{2}$$

여기서,  $Z_L$ ,  $Z_p$ ,  $Z_{SAM}$ 은 각각 로드 임피던스, 기생 임피던스, SAM(Self-Assembled Monolayer)의 임피던스이다. 식 (1)과 (2)에서 pus-bar 이동거리, $x_2$ ,는 식 (3)과 같이 측정된 출력 전압( $V_{out}$ )으로 표현된다.

$$x_2 = g_n - \sigma w_p t \left( \frac{Z_b Z_p V_{out}}{Z_p V_{in} - (Z_p + Z_b) V_{out}} - 2Z_{SAM} \right) \tag{3}$$



**Fig. 7** Nano-gap for the motion detection of the push bar: (a) a perspective view of the nano-gap; (b) an electrical model of the nano-gap

2.3 나노기계적 단백질 검출기의 작동

구동 입력( $x_1$ )과 push-bar 이동거리( $x_2$ ) 사이의 관계는 Fig. 1의 모델에 힘-평형 (force equilibrium) 관계를 적용하여 구할 수 있다.

먼저 검출대상 단백질이 없을 경우의 구동 입력( $x_1$ )과 push-bar 이동거리( $x_2$ ) 사이의 관계식은 다음과 같다:

$$x_2 = x_1 \quad (x_2 \leq (x_2)_r) \quad (4)$$

$$x_2 - (x_2)_r = \frac{k_1}{k_1 + n_r k_r} (x_1 - (x_2)_r) \quad (x_2 > (x_2)_r) \quad (5)$$

여기서,  $(x_2)_r$ ,  $k_1$ ,  $k_r$ ,  $n_r$  은 각각 검출대상 단백질이 없을 경우 접촉이 일어나기까지의 이동거리(free distance), 스프링의 강성, 리셉터의 강성, 리셉터의 개수이다.

한편 같은 방법으로 검출대상 단백질이 있을 경우의 구동 입력( $x_1$ )과 push-bar 이동거리( $x_2$ ) 사이의 관계식은 다음과 같이 얻을 수 있다.

$$x_2 = x_1 \quad (x_2 \leq (x_2)_p) \quad (6)$$

$$x_2 - (x_2)_p = \frac{k_1}{k_1 + n_p k_p} (x_1 - (x_2)_p) \quad (x_2 > (x_2)_p) \quad (7)$$

여기서,  $(x_2)_p$ ,  $k_p$ ,  $n_p$  는 각각 검출대상 단백질이 있을 경우 접촉이 일어나기까지의 이동거리(free distance), 리셉터-단백질 결합물의 강성, 리셉터-단백질 결합물의 개수이다.

식 (4), (5), (6), (7)은 검출대상 단백질이 없고 있는 두 가지 경우에 대하여 서로 다른 위치에서의 강성변화점이 존재함을 나타내고 있으며, 또한 이 두 개의 강성변화점 사이에 좌표 변화가 있음을 나타내고 있다. 따라서 검출대상 단백질의 유무는 이 강성변화점의 좌표변화를 유무를 통하여 측정될 수 있으며, 검출대상 단백질의 크기는 강성변화점의 좌표변화,  $(x_2)_r - (x_2)_p$ 에 의해 측정된다.

3. 제작공정

본 장에서는 나노기계적 단백질 검출기의 제작 공정을 소개한다. 본 제작공정은 두 장의 마스크를 사용하는 미세제작공정과 리셉터를 고정화하기 위한 화학적 공정으로 구성되어 있다.

먼저 Fig. 8 은 Fig. 5(a) 내 A-B-C 단면에서 미세제작공정을 보여준다. Fig. 8(b)에서 도시된 바와 같이, 시제품의 구조물은 SOI (Silicon on Insulator) wafer[Fig. 8(a)]의 상부 실리콘층(두께 5um)을 건식식각(deep RIE) 함으로써 형성되었다. 그 후, 산화공정[Fig. 8(c)] 및 산화막 식각공정[Fig. 8(d)]으로 나노간극의 표면을 매끄럽게 하였다. 마지막으로 전기적 연결과 리셉터 고정화를 위하여 Cr/Au 를 증착[Fig. 8(e)]하고 식각[Fig. 8(f)]하였

다. 제작된 나노기계적 단백질 검출기의 SEM 사진이 Fig. 9 에 도시되어 있다.

미소제작공정 후, 나노간극면에 리셉터를 고정화하기 위한 화학적 공정을 수행한다. SAM (Self-Assembled Monolayer)<sup>(8)</sup>을 이용하여 바이오틴(리셉터)을 나노간극에 고정하였다. 먼저 금 표면을 80° C 피라나 용액에 5 분간 처리하여 오염 물질을 제거하였다. 그 후, 금 표면 위에 1-decanethiol 과 11-mercaptoundecanol 로 이루어진 SAM 층을 형성하였다. 마지막으로, biotinamidohexanoic acid hydrazide 를 이용하여 금 표면에 바이오틴을 고정화하였다. 금 표면에 고정화된 바이오틴은 검출대상 단백질인 형광염료가 부착된 스트렙타비딘(streptavidin-FITC)과 반응하게 된다.

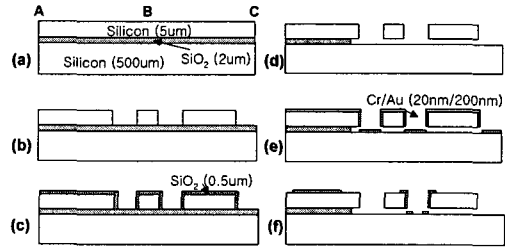


Fig. 8 Microfabrication process of the nanomechanical protein detector, showing the cross section along A-B-C in Fig. 5(a)

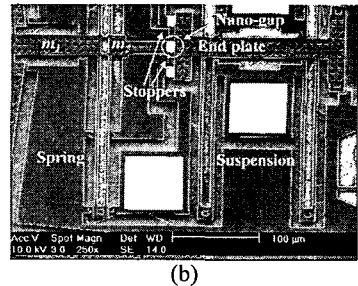
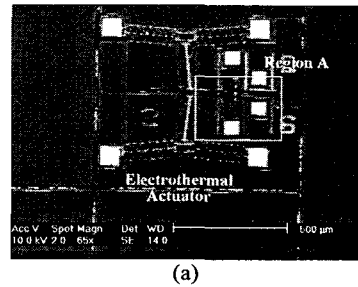


Fig. 9 SEM photographs of the nanomechanical protein detector: (a) overall structure; (b) an enlarged view of the Region A in (a)

4. 성능시험 결과

실험적 연구에서는, 검출대상 단백질이 없을 때와 있을 때의 두 경우에 대해 동일한 소자의 특성을 시험하고 그 결과를 비교함으로써, 제안된 소자의 단백질 검출능력을 검증하였다.

먼저 검출대상 단백질이 없음을 증명하기 위해 소자의 형광현미경 사진을 촬영하고, 구동 입력( $x_1$ )을 공급하면서 push-bar 의 이동거리( $x_2$ )를 측정하였다. 그 후, 검출대상 단백질과 리셉터를 반응시키기 위하여, 제작된 소자를 0.5uM 스트렙트아비딘 용액에 두 시간 동안 담그고, 10mM PBS(Phosphate-Buffered Saline)을 이용하여 세척하였다. 마지막으로 검출대상 단백질이 있음을 보이기 위해 소자의 형광현미경 사진을 촬영하고, 구동 입력( $x_1$ )을 공급하면서 push-bar 의 이동거리( $x_2$ )를 측정하였다.

Fig. 10 는 스트렙트아비딘 용액 처리후의 형광현미경 사진으로, 나노간극에서 형광이 발생하는 것이 보인다. 스트렙트아비딘 용액 처리 전에는 나노간극에서 형광이 발생되지 않으므로, 검출대상 단백질이 고정화된 리셉터와 잘 반응함을 알 수 있다.

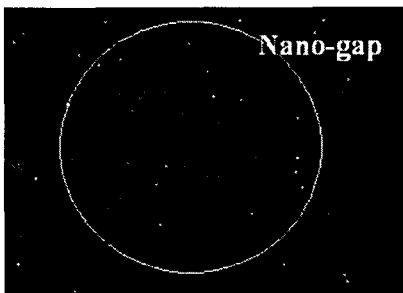


Fig. 10 Fluorescence microscope image of the nano-gap in the nanomechanical protein detector with target proteins: White circle is an identical position of Fig. 5(a)

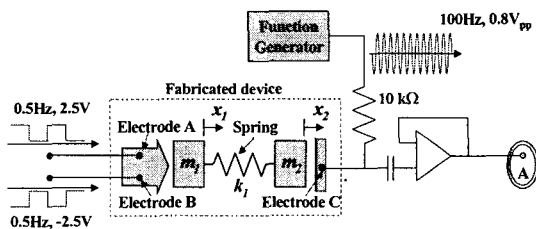


Fig. 11 Experimental apparatus for the nanomechanical protein detection

Fig. 11 은 나노기계적 단백질 검출기의 성능평가를 위한 실험장치를 나타낸다. Fig. 11 과 같이, 전기열 방식의 구동기에 사각파(0.5Hz, 5Vpp)를 공급하였으며, 나노간극에 사인파(100Hz, 0.8Vpp)를 로드 저항(10kohm)을 통하여 인가하였다. Push-bar 의 이동거리를 구하기 위한 출력 전압은 Fig. 11 의 포트 A 에서 측정되며, 측정된 출력전압은 Fig. 12 에 도시되어 있다.

Fig. 11 의 출력전압으로부터 push-bar 의 이동거리를 얻어내기 위하여, 출력전압 신호를 다음과 같이 처리하였다. 먼저, 출력전압 신호를 힐버트 변환(Hilbert transform)하여, 변환된 신호의 절대값을 구하였다. (Fig. 13) 이 신호는 Fig. 12 의 출력전압 신호의 envelope 을 의미한다. 그 후 Fig. 13 의 신호와 수식 (3)을 이용하여 Fig. 14 과 같은 push-bar 의 이동거리를 구하였다. Fig. 14 에서 표시된 push-bar 의 이동거리( $x_2$ )는 컷 오프 주파수가 12.8Hz 인 2 차 필터를 이용하여 잡음이 제거된 것이다. Fig. 15 는 검색대상 단백질이 있고 없는 두 경우에 대한 push-bar 의 이동거리( $x_2$ )를 도시하고 있다.

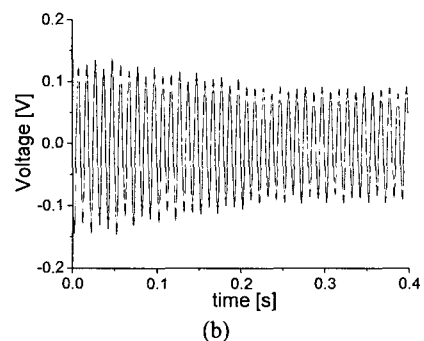
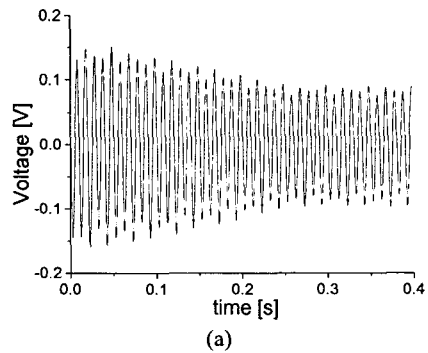


Fig. 12 Voltage signals of the nanomechanical protein detector at the port A in Fig. 10: (a) without target proteins; (b) with target proteins

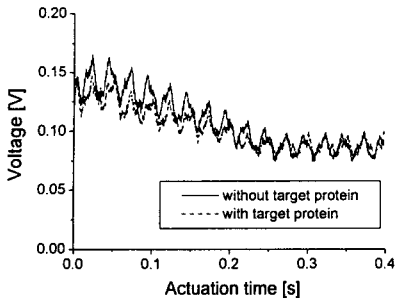


Fig. 13 Envelopes of the two voltage signals (without/with target proteins) in Fig. 11: The envelopes are calculated from the Hilbert transform

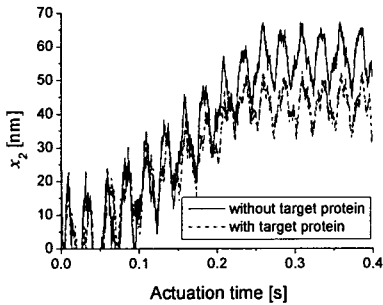


Fig. 14 Experimental push-bar motions,  $x_2$ , of the nanomechanical protein detector in two cases (without/with target proteins)

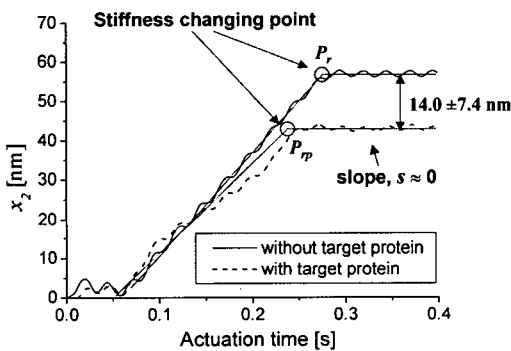


Fig. 15 Filtered push-bar motions,  $x_2$ , of the nanomechanical protein detector in two cases (without/with target proteins)

Fig. 15 에서 보는 바와 같이, 검출대상 단백질이 없을 경우와 있을 경우 각각 강성변화점( $P$ )이 관찰되었으며, 관찰된 두 강성변화점( $P$ ) 사이에 좌표변화가 존재함을 알 수 있다. 따라서, 이러한

좌표변화 유무로부터 검출대상 단백질 유무를 판별할 수 있다. 또한 좌표변화의 값으로부터 검출대상 단백질의 크기가  $14.0 \pm 7.4 \text{nm}$  임을 측정하였으며, 검출된 단백질의 크기는 종래의 연구에서 밝혀진 스트랩트아비딘의 크기(약 10nm)와 일치하였다. 따라서, 본 연구를 통해 제안한 나노기계적 단백질 검출기가 검출대상 단백질의 유무와 크기를 측정할 수 있다는 사실을 실험적으로 검증하였다.

### 5. 결론

본 논문에서는 단백질의 나노기계적 강성을 이용한 새로운 단백질 검출법 및 검출소자를 제안하였다. 종래의 기계적 공진 방식과 달리, 제안한 나노기계적 방식은 단백질의 비교적 큰 강성을 이용하므로 높은 정밀도를 가진다. 또한, 종래의 전기화학적 및 광학적 방식에 비하여, 제안한 방식은 효소 및 형광염료를 부착하는 공정과 광학적 측정장치가 필요하지 않으므로 간단하고 값싸다는 장점을 지닌다. 이러한 나노기계적 단백질 검출기를 전기열 방식의 구동기 및 나노간극을 이용하여 실제 제작하였다. 실험적 연구에서, 검출대상 단백질이 없을 때와 있을 때 각각의 경우에 강성변화점이 관찰되었으며, 관찰된 두 강성변화점 사이에 좌표변화가 존재하였다. 이로써 강성변화점의 좌표변화 유무로 검출대상 단백질의 유무를 확인하였고, 강성변화점의 좌표변화로부터 검출대상 단백질의 크기가  $14.0 \pm 7.4 \text{nm}$  임을 측정하였다. 따라서 본 나노기계적 단백질 검출기가 검출대상 단백질의 유무와 크기를 측정할 수 있다는 사실을 실험적으로 검증함으로써, 제안된 소자가 단백질 등 극미세 물질의 고정도 측정에 응용될 수 있음을 확인하였다.

### 후기

본 연구는 과학기술부의 창의적연구진흥사업의 일환인 "생체모사기법을 응용한 디지털나노구동기판의 구현에 관한 연구" 과제에 지원으로 수행되었습니다.

### 참고문헌

- (1) Rickert, J., Wessa, T. and Gopel, W., 1999, Sensors for Biomolecular Studies in Microsystem Technology: A Powerful Tool for Biomolecular Studies, *Birkhauser*, Switzerland, Chap. 12.
- (2) Zhang, J. and Kim, E.S., 2003, "Vapor and Liquid Mass Sensing by Micromachined Acoustic Resonator," *Proc. 16th IEEE Inter. Conf. Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2003)*, Kyoto Inter. Conference Hall, Kyoto, Japan (Jan. 19-23, 2003), pp. 470~473.

- (3) Rickert, J., Brecht, A. and Gopel, W., 1997, "QCM Operation in Liquids: Constant Sensitivity during Formation of Extended Protein Multilayers by Affinity," *Analytical Chemistry*, Vol. 69, No. 7 pp. 1441~1448.
- (4) Green, M.J., 1987, *New Approaches to Electrochemical Immunoassays in Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, New York, Chap. 4.
- (5) Ekins, R.P., 1998, "Ligand Assays: from Electrophoresis to Miniaturized Microarrays," *Clinical Chemistry*, Vol. 44, No. 9, pp. 2015~2030.
- (6) Homola, J., Yee, S.S. and Gauglitz, G., 1999, "Surface Plasmon Resonance Sensors: Review," *Sensors and Actuators*, Vol. B54, pp. 3~15.
- (7) Parbhu, A.N., Bryson, W.G. and Lal, R., 1999, "Disulfide Bonds in the Outer Layer of Keratin Fibers Confer Higher Mechanical Rigidity: Correlative Nano-indentation and Elasticity Measurement with an AFM," *Biochemistry*, Vol. 38, pp. 11755~11761.
- (8) Cass, T. and Ligler, F.S., 1998, *Immobilized Biomolecules in Analysis: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1998.