

맞물린 나노전극을 가지는 마이크로 캔틸레버의 제작 및 순환전압전류방법을 이용한 DNA의 선택적인 고정화

이 정 아* · 이 광 철†

(2007년 6월 18일 접수, 2008년 4월 20일 심사완료)

DNA Selective Immobilization on a Microcantilever with Nano-Interdigitated Electrodes (Nano-IDEs) Using Cyclic Voltammetry

Jung A Lee and Kwang-Cheol Lee

Key Words : Biosensor(바이오 센서), DNA Selective Immobilization(DNA의 선택적인 고정화), Electro-Polymerization(전기고분자화), Microcantilever Functionalization(마이크로 캔틸레버 기능화), Nano-Interdigitated Electrodes(맞물린 나노전극)

Abstract

We present a novel microcantilever device with nano-interdigitated electrodes (nano-IDEs) and DNA selective immobilization on the nano-IDEs for biosensing applications. Using the nano-IDEs and cyclic voltammetric methods, we have achieved selective immobilization of DNA with submicrometer spatial resolution on a freestanding microcantilever. 70~500 nm-wide gold (Au) nano-IDEs are fabricated on a low-stress SiNx microcantilever with dimensions of 100~600 μm in length, and 15~60 μm in width, with a 0.5 μm thickness using electron beam lithography and bulk micromachining. Streptavidin is selectively deposited on one side of the nano-IDEs using cyclic voltammetry at a scan rate of 0.1 V/s with a range of -0.2~0.7 V during 1~5 cycles. The selective deposition of dsDNA is confirmed by fluorescence microscopy after labeling with YOYO-1 dye.

1. 서론

마이크로 캔틸레버는 표면 분석 또는 정보 저장을 위한 SPM 탐침, 질량 센서, 가스 센서, DNA 센서, 단백질 센서와 같은 다양한 물리량, 화학량, 생화학량 측정용 센서로 널리 연구되고 있다. DNA, 단백질과 같은 생체분자들이 마이크

로 캔틸레버의 표면에 결합하였을 때 발생하는 공진주파수 및 변위 변화를 이용한 바이오 센서는 기존 형광표지를 이용한 DNA 칩, 단백질 칩에 비하여 표지를 하지 않고 고속 실시간 분석을 구현할 수 있는 장점을 가지고 있다.^(1~6)

마이크로 캔틸레버의 한쪽 표면에 외가닥 DNA 혹은 항원과 같은 생체감지물질을 형성한 후 외가닥 DNA에 상보 DNA 혹은 항체 등을 반응시키면 마이크로 캔틸레버 표면위에 형성된 생체분자사이의 정전력이 변화하게 된다. 변화된 정전력으로 인하여 마이크로 캔틸레버에 비대칭 응력이 발생하게 되며 이로 인하여 마이크로 캔틸레버의 변위변화가 발생하게 된다. 이러한 마이크로 캔틸레버의 변위차이를 측정함으로써 단

† 책임저자, 회원, 한국표준과학연구원 전략기술연구부

E-mail : kcllee@kriss.re.kr

TEL : (042)868-5737 FAX : (042)869-5046

* 회원, 한국표준과학연구원 전략기술연구부

일염기불일치와 같은 DNA 검사, 질병 진단, 신약개발과 같은 응용분야를 구현할 수 있다. 마이크로 캔틸레버 배열(array)을 이용한 다중화 바이오 센서를 구현하기 위해서는 각각의 마이크로 캔틸레버 표면에 서로 다른 DNA 및 서로 다른 생체분자를 형성시킴으로써 각각의 마이크로 캔틸레버의 선택적 기능화가 선행되어야 한다. 이를 위하여 생체감지물질로 사용되는 생체분자를 원하는 위치에 균일하고 밀도가 높으며 재현성 있게 형성시킬 수 있어야 한다.

마이크로 캔틸레버의 선택적 기능화를 위해 캔틸레버 표면위에 생체분자를 분무 또는 전기분무하거나 유체채널 및 피펫을 사용하여 형성하는 방법이 보고되고 있다.⁽⁷⁻⁹⁾ 또한 금 표면에 자발적으로 형성되는 티올(thiol)기를 포함하는 생체분자를 이용하는 방법이 주로 보고 있다. B. Ilic 등은 마이크로 캔틸레버의 끝 부분에 전자빔 리소그래피로 수십nm 지름을 가지는 금 박막을 제작하고 티올기를 이용하여 자기조립막을 형성한 바 있다.⁽¹⁰⁾ 이와 같이 티올기와 같은 반응기를 이용하여 마이크로 캔틸레버의 표면에 생체분자를 결합시키는 방법은 표면 재질에 따라 사용 가능한 반응기의 수가 제한되며 하나의 마이크로 캔틸레버 표면에 서로 다른 생체분자를 선택적으로 형성시키기가 어려운 단점을 가지고 있다.

티올기와 같은 표면 반응기를 이용하지 않고 생체분자를 기판에 고정시키는 방법으로 전기화학적인 방법을 이용하여 전도성 또는 비전도성 고분자와 함께 생체분자를 형성하는 방법이 보고되고 있다.^(11,12) 이와 같은 방법은 표면 반응기를 이용하는 방법과 달리 전극을 형성한 후 표면처리와 같은 복잡한 후처리 공정을 하지 않고 다양한 생체분자를 고분자막 형성과 동시에 형성할 수 있는 장점을 가지고 있다.

본 논문에서는 맞춤형 나노전극(nano-interdigitated electrodes, nano-IDEs)을 가지는 마이크로 캔틸레버를 제조하고, 전기화학적인 방법을 이용하여 마이크로 캔틸레버 표면에 생체분자를 선택적으로 고정화시키는 방법에 대한 연구를 수행하였다. 생체분자의 선택적인 고정화를 위한 전도성 고분자의 전기중합(electro-polymerization) 및 표면특성을 분석하는데 순환전압전류법(cyclic voltammetry, CV)을 사용하였다. 스트렙트아비딘을 함유한 고분자막을 이용하여 마이크로 캔틸레버 표면에 다양한 생체분자를 나노미터 분해능을 가지고 선택적으로 형성할 수 있다.

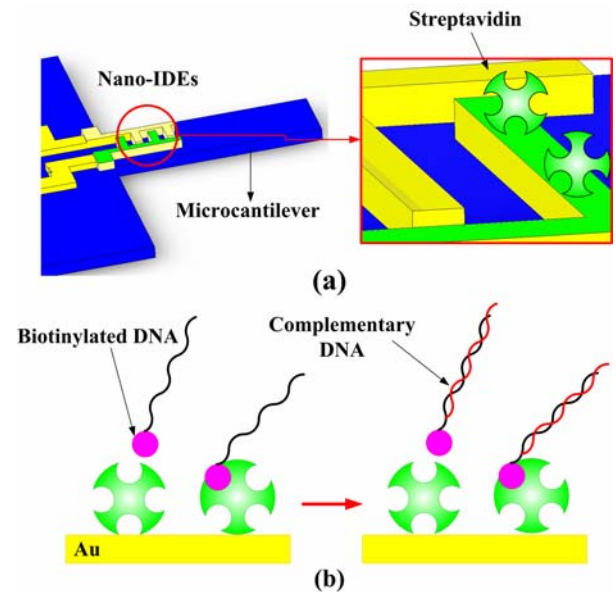


Fig. 1 Schematic of the microcantilever device with nano-interdigitated electrodes (nano-IDEs): (a) one side of the nano-IDEs on the microcantilever is selectively deposited with streptavidin by cyclic voltammetry; (b) complementary ssDNA is immobilized on the nano-IDE using streptavidin-biotin interactions

2. 소자 제작

맞물린 나노전극을 가지는 마이크로 캔틸레버 및 이를 이용한 생체분자의 선택적인 고정화에 대한 모식도를 Fig. 1에 나타내었다. 순환전압전류법을 이용하여 생체분자를 고정하기 위해 맞춤형 나노전극이 마이크로 캔틸레버의 한쪽 표면에 형성되어 있다. 전도성 고분자인 스코폴레틴(scopoletin) 단량체와 스트렙트아비딘을 포함하는 전해질 용액 내에서 일정 속도로 전위를 순환시켜 주면 나노전극의 한쪽에만 스코폴레틴의 전기중합반응에 의해 고분자막이 형성되면서 전극 근처에 있는 스트렙트아비딘이 고분자막 내부 혹은 표면에 고정된다. 표면에 형성된 스트렙트아비딘은 바이오틴을 함유하는 외가닥 DNA와 반응할 수 있는 수용체로써 역할을 하게 된다. 또한 이후 상보 DNA를 결합시킴으로써 마이크로 캔틸레버의 특정 영역에 DNA 혼성화가 일어나도록 할 수 있다. 이와 같은 방법으로 Fig. 1(a)와 같이 한쪽 나노전극에만 스트렙트아비딘 또는 그 밖의 다양한 생체분자를 형성할 수 있다.

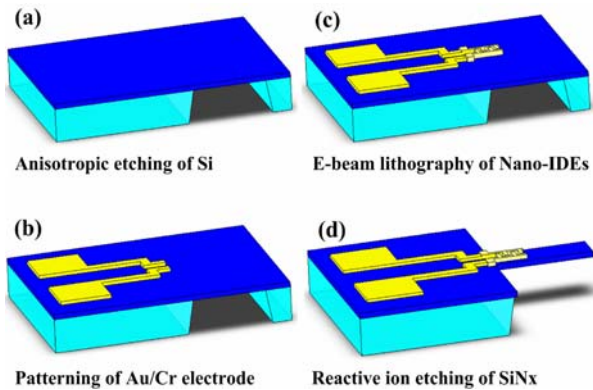


Fig. 2 Fabrication processes of the microcantilever with nano-interdigitated electrodes

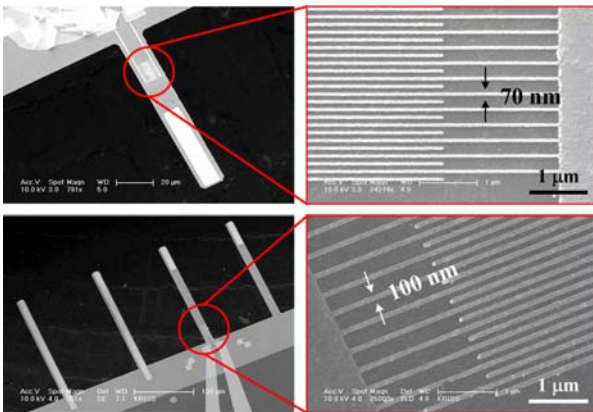


Fig. 3 SEM photomicrographs of the fabricated microcantilevers with nano-interdigitated electrodes

Fig. 2에 맞물린 나노전극을 가지는 마이크로 캔틸레버 제조 공정도를 나타내었다. 4인치 (100) 실리콘 기판에 LPCVD 방법을 이용하여 두께 0.5 μm 인 저응력 실리콘 질화막을 형성하였다. 실리콘 기판 뒷면의 실리콘 질화막을 건식 식각하여 제거한 후 25wt% TMAH 수용액을 이용하여 실리콘 기판을 식각하여 저응력 실리콘 질화막 멤브레인을 제조하였다. 전기적 연결을 위한 패드와 전자빔 리소그래피공정시 정렬 패턴을 위한 100/20 nm 두께를 가지는 금/크롬층을 전자빔 증착한 후 양성 감광막을 마스크로 이용하여 습식 식각하였다. 나노 사이즈의 선폭과 간격을 가지는 맞물린 나노전극은 전자빔 리소그래피와 리프트 오프법을 이용하여 제조하였다. 전자빔 리소그래피를 위하여 950K 4wt.% PMMA를 회전도포한 후 170 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 베이킹하였다. 전자빔 노광은 100 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 도즈, 30 keV에너지 조건에서 실시하였다. MIBK/IPA 1:1 용

액에서 현상한 후 70/20 nm 두께를 가지는 금/크롬층을 전자빔 증착하고 아세톤으로 PMMA를 제거하여 맞물린 나노전극을 제조하였다. 이후 양성 감광막을 식각마스크로 이용하여 실리콘 질화막을 건식 식각하고 양성 감광막을 제거함으로써 맞물린 나노전극을 가지는 마이크로 캔틸레버를 제조하였다.

Fig. 3에 제조된 맞물린 나노전극을 가지는 마이크로 캔틸레버의 이미지를 나타내었다. 제조된 마이크로 캔틸레버는 길이 100~600 μm , 폭 15~60 μm 이었으며 70~500 nm의 다양한 선폭을 가지는 맞물린 나노전극이 캔틸레버 표면에 형성되어 있다. 맞물린 나노전극의 다양한 선폭과 간격은 다양한 길이를 가지는 DNA의 양 끝단을 각각의 전극에 고정시킨 후 상보결합 혹은 혼성화된 DNA와 결합하는 단백질과의 상호작용 등을 인지하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

3. 선택적인 고정화 실험

3.1 순환전압전류법을 이용한 스트렙트아비딘 고정화

제조된 마이크로 캔틸레버 표면위 한쪽 나노전극에 순환전압전류법을 이용하여 스트렙트아비딘/스코폴레틴 고분자층을 형성하였다. Fig. 4(a)는 순환전압전류 실험에서 쓰이는 퍼텐셜 프로그램의 모양과 그 프로그램으로부터 얻어지는 순환전압전류 곡선의 한 예를 나타내며, Fig. 4(b)는 나노전극 위에 고분자층을 형성하기 위한 실험 개략도를 나타낸다. 실험은 BAS 100B (Bioanalytical system, Inc.)를 사용하여 진행하였다. 기준전극은 전해질 용액에 은선을 담구어 사용하였으며 작업전극과 상대전극으로 맞물린 나노전극의 각각을 사용하였다. 기준전극에 대해서 작업전극에 전위를 스캔하면서 작업전극과 상대전극 사이에서의 전류를 측정함으로써 순환전압전류 곡선을 얻는다.

시료의 양을 최소 부피화하기 위해서 전해질 용액을 담은 저장소(reservoir)로 PDMS(Sylgard 184, Dow Corning)를 사용하였다. PDMS prepolymer와 curing agent를 10:1 비율로 혼합해서 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 8시간을 오븐 안에서 유지시켰다. 고형화된 PDMS는 용액을 담을 수 있도록 구멍을 뚫고 실리콘으로부터 떼냈다. 이를 이용하여 맞물린 전극을 가지는 마이크로 캔틸레버 부분만을 20 μL 의 전해질 용액에 노출시켰다. 전해질 용액은 0.1 mol/L NaCl 용액으로써 1 mg/mL 스트렙트아비딘(Sigma)과 2 mmol/L

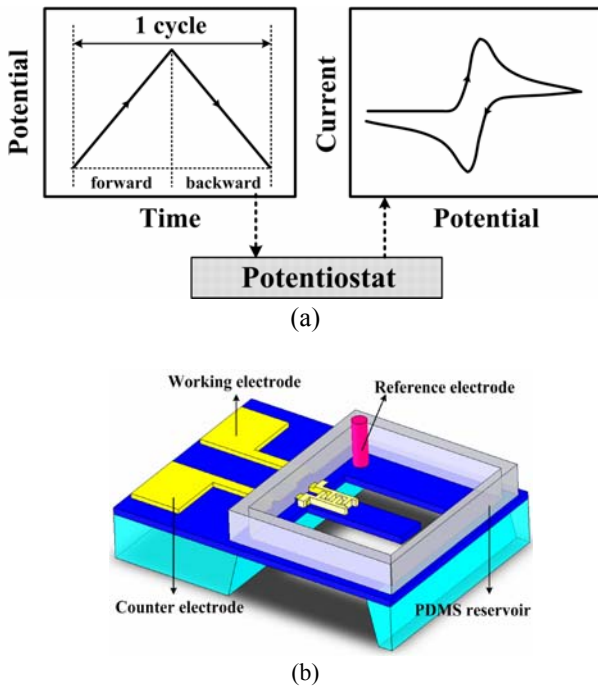


Fig. 4 (a) A potential program for CV experiment and an example of cyclic voltammogram and (b) a schematic view of the experimental setup for streptavidin selective immobilization by cyclic voltammetry

스코폴레틴(7-hydroxy-6-methoxy-coumarin, Sigma)을 녹여 사용 하였다. -0.2 V~0.7 V 범위의 전위에서 일정 속도(0.1 V/s)로 스캔하면서 전류의 변화를 관찰하였다. 실험 후 작업전극 이외의 영역에 비특이적으로 결합된 물질들을 제거하기 위해 전해질 용액을 이용하여 여러 번 세척하였다.

Fig. 5 에 마이크로 캔틸레버 위 맞물린 나노전극에 순환전압전류법을 이용하여 스트렙트아비딘/스코폴레틴 고분자층을 형성하는 동안 측정된 전류전압곡선을 나타내었다. CV 스캔주기수(scan cycle)가 증가함에 따라 최대산화전류의 위치가 0.53 V에서 0.56 V로 약간 이동하였으며, 최대산화전류값이 점차 감소하는 것을 관찰하였다. 최대산화전류 위치는 스코폴레틴을 이용한 기존 보고된 값과 유사하며,⁽¹²⁾ 최대산화전류값의 점차적인 감소는 작업전극 표면에 스트렙트아비딘/스코폴레틴 고분자층이 형성되는 정도가 증가하여 전해질 용액과 작업전극간의 전자전달(electron transfer)이 점차적으로 줄어들었기 때문으로 생각된다. 이 결과로부터 나노전극 표면에 스트렙트아비딘/스코폴레틴 고분자층이 성공적으로 형성되었음을 알 수 있었다.

우리는 전극 표면에 스트렙트아비딘/스코폴레틴

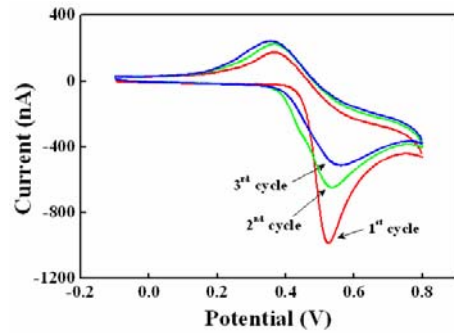


Fig. 5 Three cyclic voltammograms for the electro-deposition of streptavidin/scoptetin film

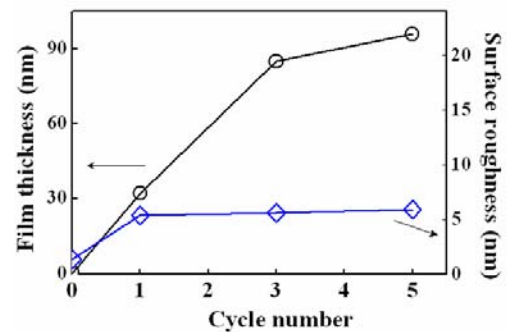


Fig. 6 Film thickness and surface roughness variations of streptavidin/scoptetin film vs. cyclic voltammometric scan cycle number

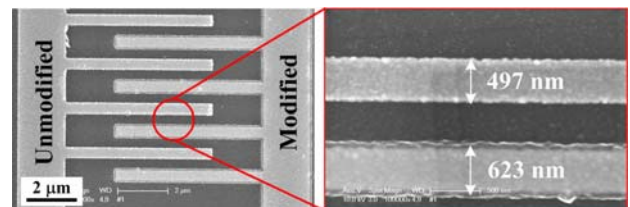


Fig. 7 SEM photomicrographs of nano-interdigitated electrodes after streptavidin/scoptetin electro-deposition with four cyclic voltammometric scans

고분자층의 형성여부를 명확히 확인하기 위해서 현미경, AFM, 그리고 SEM 을 통하여 관찰하였고 그 결과를 Fig. 6 과 Fig. 7 에 나타내었다. 전극 표면에 형성된 고분자층은 노란색을 띠며 스캔주기수가 증가함에 따라 그 색깔이 진해지는 것이 관찰되었다. CV 를 1 회 실시하였을 때 약 32 nm 두께의 고분자층이 형성되었으며, 스캔주기수가 증가함에 따라 두께와 표면거칠기는 증가하였다. 나노전극의 표면거칠기는 약 1.3 nm 이었으며 CV 를 5 회 실시하였을 때 약 5.9 nm 의 표면거칠기를 보였다. Fig. 7 은 스캔주기수를 4 회로 하여 CV 를 실시한 후의 이미지를 나타내며 결과이며 고분자층이 형

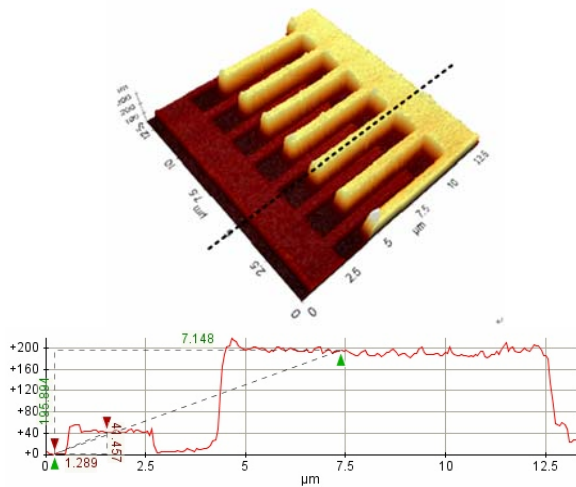


Fig. 8 An AFM image and a cross-sectional line profile of electrodes modified with streptavidin/scopoletin after labeling with fluorescein-biotin conjugate compared to unmodified electrodes

성된 나노전극의 폭이 처리되지 않은 나노전극에 비하여 대략 126 nm 증가하였음을 알 수 있다.

3.2 바이오틴의 선택적인 고정화

스코폴레틴 고분자막 내부 혹은 표면에 스트렙트아비딘이 형성되었는지의 여부를 확인하기 위하여, 스트렙트아비딘이 바이오틴과 특이적 결합하는 성질을 이용하여 형광물질이 표지된 바이오틴 ($\lambda_{ex}=488 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=520 \text{ nm}$)을 시편에 결합시키는 실험을 수행하였다. 형광물질이 표지된 바이오틴 (125 mg/ml)을 포함하는 완충용액(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4)에 마이크로 캔틸레버를 30 분 동안 담가두어 나노전극에 형성된 스트렙트아비딘에 바이오틴이 결합하도록 하였다. 형광현미경을 통하여 한쪽 나노전극에만 선택적으로 스트렙트아비딘이 형성되어 있음을 확인하였고 Fig. 8의 AFM 측정결과로부터 약 150 nm 두께를 가지는 바이오틴/스트렙트아비딘/스코폴레틴 고분자층이 균일하게 형성되어 있음을 알 수 있었다.

3.3 DNA의 선택적인 고정화

CV를 이용하여 맞물린 나노전극에 형성시킨 스트렙트아비딘을 이용하여 마이크로 캔틸레버 표면에 외가닥 DNA의 고정화 및 혼성화 실험을 실시하였다. 스트렙트아비딘이 형성된 마이크로 캔틸레버를 바이오틴이 결합된 외가닥 DNA(5'-biotin-CGC ATT CAG GAT TCT CAA CTC-3')를 포함한 10 mM 완충용액(pH 7.4)에 1 시간 담가두어 외가닥 DNA를 나노전극에 결합시켰

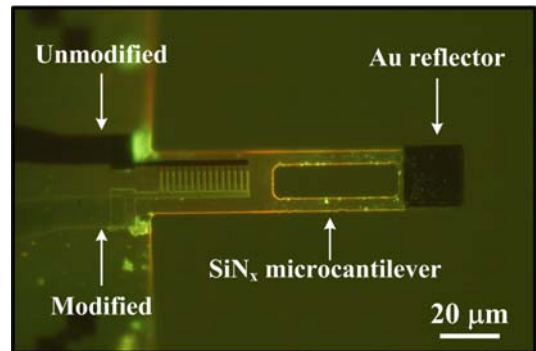


Fig. 9 Fluorescence microscope image of the fabricated microcantilever with selectively functionalized nano-interdigitated electrodes after labeling with YOYO-1

다. 반응하지 않은 DNA를 제거하기 위해 Tween 20을 포함하는 완충용액을 이용하여 세척하였다. DNA 혼성화 실험을 위해서 상보 DNA를 포함하는 0.3 M 완충용액(pH 7.4)에 4 시간 동안 담가 두었다. 이후 완충용액으로 세척한 후 혼성화가 잘 이루어졌는지의 여부를 판단하기 위해 형광물질(YOYO-1)를 사용하였다. 형광물질을 포함하는 10 mM 완충용액(pH 7.4)에 샘플을 30 분 동안 넣어두어 형광물질을 혼성화된 DNA와 결합시켰다. 형광물질을 표지한 후 완충용액을 이용하여 세척하였다.

Fig. 9에 나노전극에 혼성화된 DNA를 형광물질로 표지한 후 마이크로 캔틸레버의 형광현미경 사진을 나타내었다. 제조한 저응력 실리콘 질화막 마이크로 캔틸레버는 길이 200 μm , 폭 20 μm , 두께 0.5 μm 이었으며 500 nm 선폭 및 간격을 가지는 맞물린 나노전극 및 금 반사판을 포함하고 있다. 형광현미경 사진을 통해 DNA 혼성화는 스트렙트아비딘이 고정된 한쪽 나노전극에서만 선택적으로 일어나며 DNA 혼성화를 마이크로 캔틸레버의 선택적인 영역에서 일하게 할 수 있음을 알 수 있다. 이 기술은 나노스케일의 변위를 감지하는 마이크로 캔틸레버 바이오 센서분야에서 생체물질들을 검출하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 전기화학적 방법을 이용하여 마이크로 캔틸레버에 나노미터 분해능을 가지고 선택적으로 생체분자를 형성시키는 연구를 수행하였다. 맞물린 나노전극을 가지는 마이크로

캔틸레버를 제조하고, 순환전류전극방법을 이용하여 스트랩트아비딘을 포함한 스코플레틴 고분자층을 맞물린 나노전극에 선택적으로 형성하였다. 나노전극에 고정된 스트랩트아비딘을 활용하여 바이오틴을 포함하는 DNA 의 고정화 및 혼성화 실험을 수행하였다.

선폭 70~500 nm 인 맞물린 나노전극을 포함하는 길이 100~600 μm , 폭 15~60 μm , 두께 0.5 μm 저응력 실리콘 질화막 마이크로 캔틸레버를 포토리소그래피와 전자빔 리소그래피를 이용하여 제조하였다. 스캔 범위 -0.2~0.7 V, 속도 0.1 V/s, 주기수 1~5 회로 수행된 순환전압전류법을 이용하여 맞물린 나노전극의 한쪽에만 스트랩트아비딘을 포함하는 스코플레틴 고분자층을 형성하였다. 바이오틴과 스트랩트아비딘의 특이적 결합반응을 이용하여, 바이오틴이 결합된 외가닥 DNA 를 각각 스트랩트아비딘이 고정된 나노전극에 결합시키고 상보 DNA 를 혼성화시켰다. 이는 형광물질로 표지한 후 형광현미경을 통하여 DNA 혼성화가 성공적으로 이루어졌음을 확인하였다.

본 연구는 나노스케일의 변위를 감지하는 마이크로 캔틸레버 뿐만 아니라 마이크로 구조물을 이용한 바이오 센서분야에서 생체물질들을 선택적으로 고정시킨 후 인지하는 데 유용하게 사용되리라 사료된다.

후 기

본 연구는 교육인적자원부의 BK21 프로그램의 지원을 받아 수행되었으며, 전기화학 실험에 도움을 주신 황성필 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

- (1) Lang, H. P., Hegner, M., Meyer, E. and Gerber, Ch., 2002, "Nanomechanics from Atomic Resolution to Molecular Recognition Based on Atomic Force Microscopy Technology," *Nanotechnology*, Vol. 13, pp. R29~R36.
- (2) Raiteri, R., Nelles, G., Butt, H.-J., Knoll, W. and Skladal, P., 1999, "Sensing of Biological Substances

- Based on the Bending of Microfabricated Cantilevers," *Sens. Actuators B*, Vol. 61, pp. 213~217.
- (3) Fritz, J., Baller, M. K., Lang, H. P., Rothuizen, H., Vettiger, P., Meyer, E., Güntherodt, H.-J., Gerber, Ch. and Gimzewski, J. K., 2000, "Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics," *Science*, Vol. 288, pp. 316~318.
 - (4) Yue, M., Lin, H., Dedrick, D. E., Satyanarayana, S., Majumdar, A., Bedekar, A. S., Jenkins, J. W. and Sundaram, S., 2004, "A 2-D Microcantilever Array for Multiplexed Biomolecular Analysis," *J. Microelectromech. Syst.*, Vol. 13, No. 2, pp. 290~299.
 - (5) Alvarez, M., Calle, A., Tamayo, J., Lechuga, L. M., Abad, A. and Montoya, A., 2003, "Development of Nanomechanical Biosensors for Detection of the Pesticide DDT," *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 18, pp. 649~653.
 - (6) Raiteri, R., Grattarola, M., Butt, H.-J. and Skladal, P., 2001, "Micromechanical Cantilever-based Biosensors," *Sens., Actuator B*, Vol. 79, pp. 115~126.
 - (7) Savran, C. A., Sparks, A. W., Sihler, J., Li, J., Wu, W.-C., Berlin, D. E., Burg, T. P., Fritz, J., Schmidt, M. A. and Manalis, S. R., 2002, "Fabrication and Characterization of a Micromechanical Sensor for Differential Detection of Nanoscale Motions," *J. Microelectromech. Syst.*, Vol. 11, No. 6, pp. 703~708.
 - (8) Wright, Y. J., Kar, A. K., Kim, Y. W., Scholz, C. and George, M. A., 2005, "Study of Microcapillary Pipette-assisted Method to Prepare Polyethylene Glycol-coated Microcantilever Sensors," *Sens. Actuator B*, Vol. 107, pp. 242~251.
 - (9) Kim, J. W., Yamagata, Y., Kim, B. J., Takeuchi, S. and Higuchi, T., 2003, "Biosensor Based on SU-8 Cantilever by Using the Electrospray Deposition of Proteins," *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems 2003*, Boston, USA, pp. 399~402.
 - (10) Ilic, B., Craighead, H. G., Krylov, S., Senaratne, W., Ober, C. and Neuzil, P., 2004, "Attogram Detection Using Nanoelectromechanical Oscillators," *J. Appl. Phys.*, Vol. 95, No. 7, pp. 3694~3703.
 - (11) Rodríguez, M. I. and Alocilja, E. C., 2005, "Embedded DNA-polypyrrole Biosensor for Rapid Detection of Escherichia Coli," *IEEE Sensors J.*, Vol. 5, No. 4, pp. 733~736.
 - (12) Hölzel, R., Gajovic-Eichelmann, N. and Bier, F. F., 2003, "Oriented and Vectorial Immobilization of Linear M13 dsDNA between Interdigitated Electrodes-Towards Single Molecule DNA Nanostructures," *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 18, pp. 555~564.