

나이트로벤젠다이아조늄 양이온의 화학 및 전기화학 반응을 이용한 실리콘 표면상으로의 단백질 고정

김규원* · 하크 알-몬술 · 강현주

인천대학교 화학과

(2010년 2월 1일 접수: 2010년 2월 15일 채택)

Immobilization of Proteins on Silicon Surfaces Using Chemical and Electrochemical Reactions of Nitrobenzenediazonium Cations

Kyuwon Kim*, Al-Monsur Jiaul Haque, and Hyeonju Kang

Department of chemistry, University of Incheon, Incheon 406-772, Korea

(Received February 1, 2010 : Accepted February 15, 2010)

요 약

전기화학 반응을 이용한 실리콘 표면상으로의 단백질 고정을 연구하였다. 이를 위해 Nitrobenzenediazonium(NiBD) 양이온을 화학적 환원반응을 통해 수식하고 수식된 실리콘 표면을 전기화학적으로 다시 환원시켜 나이트로 기능기를 일차아민 기능기로 활성화하여 단백질 고정 이용하였다. 활성화 된 표면에 금 나노입자를 고정하여 일차 아민 생성을 확인하였다. 또한 이 방법을 응용하여 실리콘 나노선 어레이 중 선택된 나노선 만을 활성화하고 단백질을 선택적으로 고정하는 연구를 수행하였다. 이 연구를 통하여 NiBD 양이온의 화학 및 전기화학 반응이 실리콘 나노선 표면으로 단백질의 선택적 고정화에 유용하게 사용될 수 있음을 보였다.

Abstract : The immobilization of proteins on silicon surfaces using electrochemical reaction has been studied. Chemical deposition of nitrobenzenediazonium (NiBD) cations is employed to modify silicon surfaces. Electrochemical reduction of nitro-group to primary amine-group have been conducted on the modified surfaces to activate silicon surfaces for the protein immobilization. Attachment of gold nanoparticles was used to prove the reduction. The current method was applied to selective activation of a silicon nanowire and immobilize proteins on the selected nanowire. It has been demonstrated that the use of chemical and electrochemical reaction NiBD is efficient for the selective immobilization of proteins on silicon nanowire surfaces.

Keywords : Aryldiazonium cation, Electrochemistry, Silicon modification, Selective immobilization of protein, Silicon nanowires

1. 서 론

실리콘의 바이오센서의 기관으로의 응용은 정보기술과 바이오기술이 결합된 융합 기술의 결정적 산물로 인식되고 있다. 최근 들어서는 일반 실리콘에서 한발 나아가 실리콘

나노선을 이용한 바이오센서가 개발되고 있다. 나노선이 가지는 화학 전계 효과(chemical field effect transistor, ChemFET)의 원리를 응용하여 형광물질 등의 표지도입 없이 단백질이나 유전자를 고감도로 검출하는 연구들이 활발히 진행 중이다.¹⁾

단백질 같은 생체물질의 고정화 기술은 바이오센서의 제작에 있어 필수 요소이며 그중에서도 전기화학 반응을 이용

*E-mail: kyuwon_kim@incheon.ac.kr

한 표면 활성화를 통한 고정 방법은 원하는 전극 어레이가 배열된 기판 상에서 원하는 전극들에만 선택적으로 생체 물질을 고정시킬 수 있다.^{2,5)} 이 방법을 이용하면 값비싼 어레이 로봇이 없이도 다중 감지가 가능한 바이오칩을 만들 수 있는 장점이 있다. 특히 나노선 사이의 간격이 마이크로 미터 단위 보다 작은 나노선 소자를 이용하여 다중 감지를 구현할 경우 전기화학적 방법이 매우 유용하게 적용되어 질 수 있다. 전기화학적 표면 활성화를 위한 방법으로 가장 널리 이용되어온 것으로는 전기화학 활성의 단위체를 사용한 전기중합(electropolymerization)이나 전기화학 활성의 알칸싸이올의 자기조립박막(self-assembled monolayers) 형성 등이 있다.⁶⁾ 탄소나 실리콘 같은 4족 원소의 표면을 전극으로 활용할 때는 aryldiazonium(AD) 양이온의 전기화학적 반응이 이용되어져 왔다.⁷⁻⁹⁾ 단백질이나 단백질의 리간드가 달라붙을 수 있는 기능기(R)를 가진 AD 양이온과 sodiumdodecylsulfate (SDS) 같은 계면 활성제를 혼합한 용액에 탄소나 실리콘 표면을 노출시키고 환원 전압을 인가하면 AD가 표면에 수식될 수 있다.¹⁰⁾

우리는 지난 논문에서 carboxymethylbenzenediazonium (CMBD) 양이온의 전기화학반응을 이용하여 실리콘 나노선 표면상으로의 금 나노입자 선택적 고정화 결과를 보고한 바 있다.¹¹⁾ 본 연구에서는 nitrobenzediazonium(NiBD) 양이온의 화학적 수식과 수식된 표면의 전기화학적 환원 반응을 이용하여 실리콘 표면상으로 단백질의 선택적 고정화를 제시하고자 한다(Fig. 1. 참고) 또한 이 방법을 응용하여 실리콘 나노선 어레이 중 선택된 나노선만을 활성화하고 단백질을 선택적으로 고정하는 연구를 수행한다. 이 연구를 통하여 NiBD 양이온의 전기화학 반응이 실리콘 나노선 표면상으로 단백질의 선택적 고정화에 유용하게 사용될 수 있음을 보이고자 한다. AD 양이온의 전기화학을 이용한 실리콘 나노선 어레이 상으로 단백질의 선택적 고정화에 관한 연구는 아직 보고된 적이 없다.^{5,12)}

2. 실험

2.1. 실험 재료

NiBD cation salt, bromobenzenediazonium(BrBD) cation salt, ammonium fluoride(NH₄F), SDS, streptavidin

(SA)-gold nanoparticle(GNP) conjugate은 시그마-알드리치, biotin-(PEO)₂-NHS는 Pierce에서 구입하였다. 다른 시약은 특별한 언급이 없으면 시그마-알드리치에서 구입하여 사용하였다. 사용한 실리콘 웨이퍼로는 저항이 <0.005 ohm.cm 인 N-type Si(100) (prime 급)을 사용하였으며 폴리싱이 이루어진 면만 전극부분으로 활용하였다.

2.2. NiBD를 이용한 실리콘 표면의 수식

실리콘 웨이퍼는 전극으로 사용 전에 40% NH₄F 수용액에서 20분 이상 에칭시켜 실리콘 산화막을 제거하였다. NiBD의 화학적 수식을 위해 약 30 mM 농도의 NiBD와 SDS가 들어있는 용액 속에 실리콘 표면을 담가 24시간 교반하며 반응시켰다. 모든 전기화학 실험은 Ivium사의 compactstat을 사용하여 수행하였다. 작업전극으로는 실리콘 표면을 기준전극은 Cypress사의 Ag/AgCl를 보조 전극으로는 백금 선을 사용하였다.

실리콘 나노선이 탑재된 소자는 한국전자통신연구원에서 제작되었고 2009년에 발표한 논문에서와 같은 방법으로 사용되었다.^{11,13)} Polydimethylsiloxane(PDMS) 재질의 전기화학 셀을 제작하여 소자 기판 상에 눌러 고정시켜 전해질 용액이 새지 않게 하였다. 나노선 중에서 몇 개만 골라 이 나노선에 연결된 금 박막의 패드 상에 일정 전위기에 연결된 작업전극 용 금속 프루브를 눌러 접촉시켜 전기화학적 신호를 가하였다.

2.3. NiBD로 수식된 실리콘 표면의 전기화학 및 화학 반응

NiBD가 수식된 실리콘 웨이퍼 표면의 나이트로 기능을 일차아민으로 변형시키기 위하여 0.1 M KCl 전해질을 가지는 물과 에탄올의 9:1 혼합용액에서 전기화학적으로 환원시켰다.¹⁰⁾ 이렇게 해서 얻어진 표면에 일차아민의 생성을 확인하기 위하여 금 나노입자를 반응시키고 은 염색(silver enhancement) 검출법을 이용하였다.⁵⁾ 이 방법들은 이미 발표된 논문의 방법을 그대로 이용하였다. NiBD가 수식된 실리콘 나노선의 사용에 있어서도 마찬가지로 물과 에탄올 혼합용액을 사용하여 일차아민을 생성시킨 후 위의 웨이퍼에서의 과정과 유사하게 SA-GNP conjugate를 고정시키고 금 나노입자의 분포를 주사전자현미경(SEM)을 통해 관찰

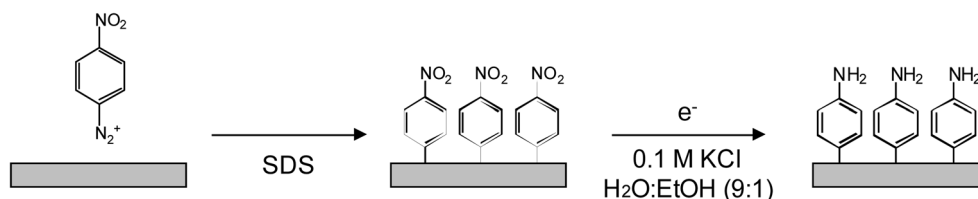


Fig. 1. Chemical deposition of NiBD cation on electrode surfaces and electrochemical reduction from nitro group to primary amine group on the NiBD-deposited surfaces.

하였다. SA 단백질의 비특이적인 흡착을 줄이기 위하여 SA-GNP conjugate는 phosphate-buffered saline(PBS)과 0.5% tween 20을 포함하는 PBST 용액에 녹여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. NiBD 양이온을 이용한 실리콘 표면의 수식

실리콘은 비가역적으로 산화되면 전도성을 잃어버리기 쉬운 특성 때문에 표면을 전극으로 사용하는 것은 한계가 있으나 전기화학적 환원 반응을 이용하는 작업에는 전도도의 손해를 최소화 할 수 있어 전극으로의 사용이 가능하다.¹¹⁾ 또한 실리콘의 산화막은 나노전자소자 센서의 감도를 감소 시키므로 화학 및 전기화학 반응 시 환원반응에 의한 물질의 고정화가 가능하게 하는 것이 바람직하다. 따라서 환원 반응에 의해 실리콘 표면에 수식이 가능한 AD 양이온을 이용하였다. 다양한 기능기 중에서 일차아민을 가지는 AD 양이온을 고정시킨 뒤 추가의 표면 반응을 진행하여 단백질을 선택적으로 고정시키는 과정을 구현하고자 하였다. 하지만 일차아민 기능기기가 도입된 AD는 상업적으로 판매되지 않으므로 NiBD를 이용하였다.(Fig. 1. 참고) 벤젠 고리에 붙어있는 나이트로 기능기는 전기화학적 환원반응에 의해 일차아민으로의 변형이 가능성이 알려져 있기 때문이다.¹⁰⁾

NiBD의 수식은 화학 및 전기화학, 두 가지 방법으로 모두 가능하나 본 연구에서는 화학반응을 이용하였다. 실리콘 웨이퍼를 적당한 크기로 자르고 지난 논문에서와 같은 과정으로 40% NH_4F 로 산화막을 제거한 후 이후의 반응에 사용하였다.¹¹⁾ NiBD와 SDS의 혼합용액을 24시간 반응시켜 화학적으로 수식 시킨 후 생성된 박막이 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 이온에 대한 실리콘 전극 표면으로의 전자전달 반응을 방해하는 정도를 관찰하였다. Fig. 2(a)에서 볼 수 있듯이 NiBD를 반응시키지 않은 표면에서는 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 의 환원

및 산화 봉우리가 관찰되었으나. NiBD 용액에서 화학 및 전기화학반응을 보낸 실리콘 표면에 대한 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 이온의 반응은 박막에 의한 전자전달에 대한 반응속도론적 에너지 장벽 때문에 전류 봉우리가 관찰되지 않았으며 이 현상은 이미 보고된 논문의 내용과 일관성 있는 결과이다.^{11,14)} 우리는 이 결과로부터 NiBD의 박막이 형성되었음을 간접적으로 알 수 있었다.

3.2. NiBD가 수식된 실리콘 표면의 반응

NiBD가 수식된 실리콘 표면은 나이트로 기능기를 가진 이 것은 반응성이 약하므로 일차아민으로 변형시켜야만 추가적인 결합에 이용할 수 있다. 이를 위하여 NiBD가 수식된 표면을 0.1 M KCl 전해질을 가지는 물과 에탄올의 9:1 혼합용액에서 전기화학적으로 환원시켰다. Fig. 2(b)에서 일차아민 생성을 위해 사용된 CV를 보여준다. 첫 번째 순환(실선)에서 보이는 봉우리가 두 번째(점선)에서는 사라짐이 관찰되었으며 이것을 통해 첫 번째 순환 동안 모든 나이트로 기능기가 전기화학 반응에 의해 모두 환원되었음을 추측할 수 있었다.

화학적으로 NiBD가 수식된 표면에 전기화학적 환원으로 일차아민이 생성된 것을 확인하기 위하여 금 나노입자가 나이트로 기능기에는 잘 달라붙지 않지만 일차아민 기능기에는 잘 달라붙는 현상을 이용하였다. Fig. 3(a)와 같이 NiBD가 수식된 실리콘 표면의 일부분을 전기화학적으로 환원시킨 후 씻어준 뒤 다시 전체 표면을 금 나노입자 용액에 2시간 노출시킨 후 은 염색방법으로 검출하였다.⁵⁾ Fig. 3(b)에서는 앞의 과정에 의해 얻어진 표면을 광학 현미경으로 관찰한 사진을 보이고 있다. 환원반응을 시킨 경계의 아래 부분에 집중적으로 은 이온의 침전으로 인한 짙은 색이 관찰되었고 환원되지 못한 나이트로 기능기로 남아있는 위 부분은 상대적으로 침전양이 적은 것을 알 수 있다. 이 결과는 나이트로 기능기가 전기화학 반응

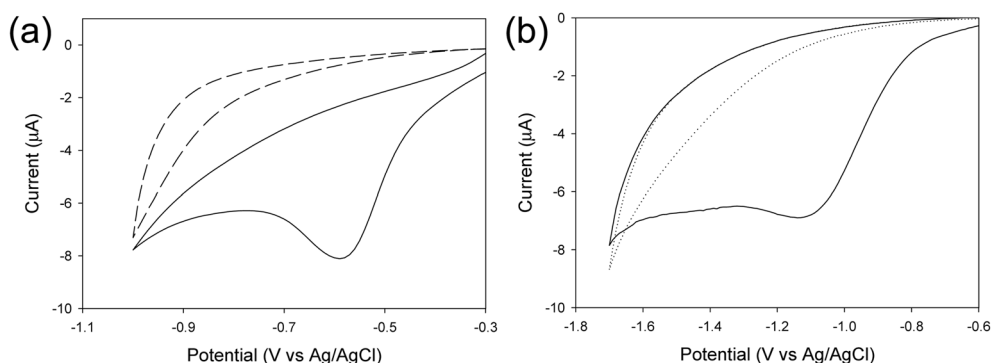


Fig. 2. (a) Cyclic voltammograms of an aqueous solution with 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ and 0.1 M KCl on a H-Si surface before (solid line), and after (dashed line) chemical deposition of NiBD. Scan rate is 50 mV/sec. (b) Cyclic voltammograms for the electrochemical reduction of NiBD-modified silicon surfaces prepared from chemical deposition. Scan rate: 50 mV/sec.

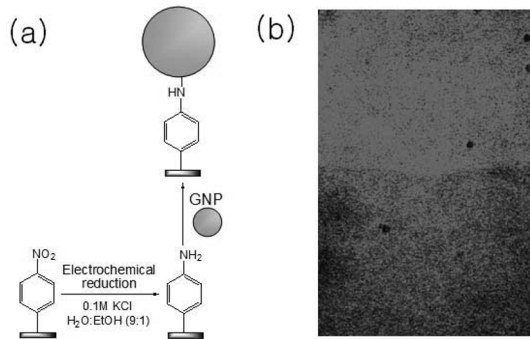


Fig. 3. (a) Reaction scheme for attachment of GNPs onto NiBD-deposited silicon surfaces. (b) A pattern image obtained from silver enhancement after GNPs treatment.

에 의해 성공적으로 일차아민 기능기로 환원되었으며 이를 통하여 금 나노 입자가 선택적으로 고정될 수 있었음을 말해준다.

3.3. 화학적 방법으로 NiBD가 수식된 실리콘 나노선 표면의 반응

실리콘 나노선 어레이 기판 상에서 특정 나노선에 선택적으로 SA 단백질을 고정시키는 연구를 수행하였다. 먼저 실리콘웨이퍼의 수식을 위해 사용된 것과 같은 조성의 NiBD 용액으로 화학적으로 수식시킨 후 물과 에탄올 혼합용액을 사용하여 실리콘 나노선을 전기화학적으로 환원시켰다. 이 전기화학적인 환원반응에 대한 CV 결과는 Fig. 4(a)와 같다. 약 -1V 근처에서 환원 봉우리가 나타났으며 이것은 실리콘 웨이퍼를 잘라 만든 전극을 같은 과정을 거쳐서 준비한 것에 대한 CV인 Fig. 3(a)에서의 결과와 유사하다. 나이트로 작용기가 없는 BrBD 양이온을 SDS와 섞은 용액에 24시간 동안 실리콘 나노선 기판을 노출시킨 후 같은 조건에서 얻은 CV에서는 첫 번째 순환에서 봉우리가

나타나지 않았다.(Fig. 4(b)) 따라서 나이트로 작용기가 고정된 실리콘 나노선 표면에서도 일차아민 그룹이 성공적으로 얻어졌음을 확인할 수 있었다.

SA 단백질을 고정하기 위하여 바이오틴을 사용하였다. 전체 나노선에 NiBD를 화학적으로 수식한 후 선택된 몇 개의 나노선들만 전기화학적으로 환원시켰다. 이후 Fig. 5(a)와 같은 방법으로 기판 전체를 biotin-(PEO)₂-NHS를 반응시킨 후 얻어진 기판 표면을 SA-GNP conjugate를 포함하는 PBST 용액에 노출시키고 금 나노입자의 분포를 주사전자현미경(SEM)을 통해 관찰하였다. Fig. 5(b)에서 전기화학 환원 반응을 시킨 나노선(위)과 시키지 않은 나노선(아래)에 대해 주사전자현미경을 사용하여 금 나노입자의 분포를 관찰한 결과를 비교하여 나타내었다. 실제 소자 상에서는 인접한 나노와이어 사이의 간격이 200 μm이나 나노와이어간의 비교를 용이하게 하기위하여 겹쳐 제시하였다. 전기화학 반응으로 NiBD를 선택적으로 환원 반응시킨 위 부분의 나노선에만 주로 금 나노입자가 고정된 것을 볼 수 있다. 이 결과는 NiBD의 사용으로 실리콘 나노선 상으로의 단백질의 선택적 고정화가 가능함을 말해준다. SA의 비특이적인 흡착을 줄이기 위한 전처리과정을 최적화하면 보다 선택성이 높은 단백질의 고정화가 가능할 것으로 예상된다.

4. 결 론

NiBD 양이온의 화학적 고정반응을 통해 단백질을 실리콘 표면에 선택적으로 고정시키는 방법을 개발하였다. NiBD를 전기화학적으로 환원 반응시킨 영역에만 나노입자나 기능성 물질이 지배적으로 고정됨을 확인하여 우리의 방법이 실리콘 표면상에서 위치 선택적 단백질 고정화에 효율적임을 증명하였다. 이 방법은 다종의 단백질을 서로 다른 실리콘 나노선 상에 고정하여 다중검출이 가능한 무표지, 고감도 나노선 센서 제작에 응용될 것으로 기대된다.

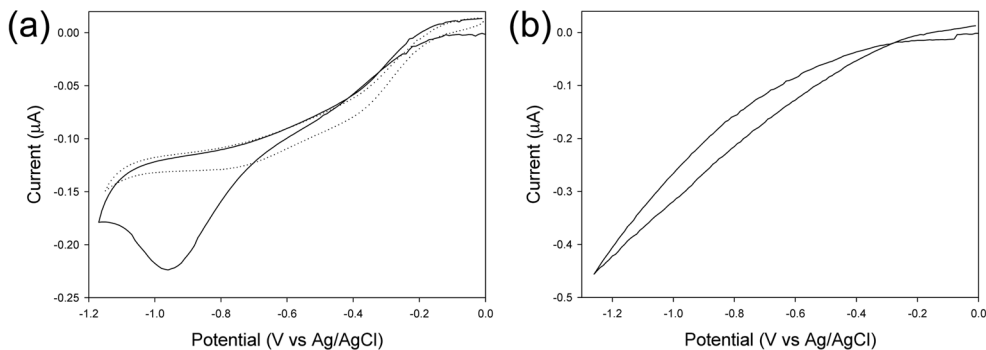


Fig. 4. (a) A cyclic voltammogram for the electrochemical reduction of silicon nanowire surfaces prepared from chemical deposition of NiBD and BrBD. Scan rate: 50 mV/sec.

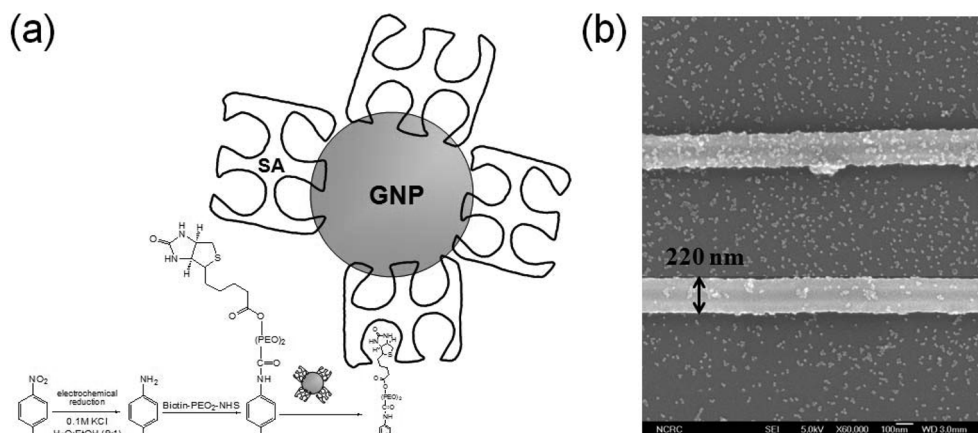


Fig. 5. (a) Chemical reaction process for immobilizing SA-GNP conjugate onto NiBD-deposited silicon nanowire surface. (b) Scanning electron micrographs revealing the selective immobilization of SA-GNP conjugate via chemical deposition of NiBD followed by electrochemical reduction of the resulting surface. Top wire was subjected to the electrochemical reduction. Bottom one was not subjected.

감사의 글

이 논문은 2007년 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-313-2007-2-C00482). 본 연구는 또한 한국전자통신연구원에서 부분적으로 지원되었음.

참고문헌

1. G. Zheng, F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang, and C. M. Lieber, 'Multiplexed Electrical Detection of Cancer Markers with Nanowire Sensor Arrays' *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1294 (2005).
2. M. N. Yousaf and M. Mrksich, 'Diels-Alder Reaction for the Selective Immobilization of Protein to Electroactive Self-Assembled Monolayers' *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4286 (1999).
3. K. Kim, H. Yang, S. Jon, E. Kim, and J. Kwak, 'Protein Patterning Based on Electrochemical Activation of Bioinactive Surfaces with Hydroquinone-Caged Biotin' *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15368 (2004).
4. A.-M. J. Haque, S.-R. Kwon, H. Park, T.-H. Kim, Y.-S. Oh, S.-Y. Choi, J.-D. Hong, and K. Kim, 'Use of 1,3-Dithiane Combined with Aryldiazonium Cation for Immobilization of Biomolecules Based on Electrochemical Addressing' *Chem. Commun.*, 4865 (2009).
5. Y. Bunimovich, G. Ge, R. Ries, K. Beverly, L. Hood, and J. Heath, 'Electrochemically Programmed, Spatially Selective Biofunctionalization of Silicon Wires' *Langmuir*, **20**, 10630 (2004).
6. S. Cosnier, 'Biomolecule Immobilization on Electrode Surfaces by Entrapment or Attachment to Electrochemically Polymerized Films' *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 443 (1999).
7. M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, and J.-M. Savéant, 'Covalent Modification of Carbon Surfaces by Grafting of Functionalized Aryl Radicals Produced from Electrochemical Reduction of Diazonium Salts' *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 5883 (1992).
8. A. Shabani, A. Mak, W. H. Gerges, I. L. Cuccia, and M. F. Lawrence, 'DNA Immobilization onto Electrochemically Functionalized Si(100) Surfaces' *Talanta*, **70**, 615 (2006).
9. S. Griveau, D. Mercier, C. Vautrin-UI, and A. Chausse, 'Electrochemical Grafting by Reduction of 4-Aminoethylbenzenediazonium Salt: Application to the Immobilization of (Bio)Molecules' *Electrochem. Commun.*, **9**, 2768 (2007).
10. C.-S. Lee, S. E. Baker, M. S. Marcus, W. Yang, M. A. Eriksson, and R. J. Hamers, 'Electrically Addressable Biomolecular Functionalization of Carbon Nanotube and Carbon Nanofiber Electrodes' *Nano Lett.*, **4**, 1713 (2004).
11. S. Park, C. S. Ah, and K. Kim, 'Spatially Selective Immobilization of Functional Materials onto Silicon Surfaces Using Electrochemical Method' *J. Kor. Electrochem. Soc.*, **12**, 40 (2009).
12. R. D. Rohde, H. D. Agnew, W.-S. Yeo, R. C. Bailey, and J. R. Heath, 'A Non-Oxidative Approach toward Chemically and Electrochemically Functionalizing Si(111)' *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 9518 (2006).
13. A. Kim, C. S. Ah, H. Y. Yu, J.-H. Yang, I.-B. Baek, C.-G. Ahn, C. W. Park, M. S. Jun, and S. Lee, 'Ultrasensitive, Label-Free, and Real-Time Immunodetection Using Silicon Field-Effect Transistors' *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 103901 (2007).
14. C. J. Barrelet, D. B. Robinson, J. Cheng, T. P. Hunt, C. F. Quate, and C. E. D. Chidsey, 'Surface Characterization and Electrochemical Properties of Alkyl, Fluorinated Alkyl, and Alkoxy Monolayers on Silicon' *Langmuir*, **17**, 3460 (2001).