

요소센서를 위한 3-mercaptopropionic acid 자기조립 단일층의 전기화학적 특성 분석

윤 동화, 송 민정, 김 중훈, 강 문식, 민 남기, 홍 석인  
고려대학교

Electrochemical characterization of 3-mercaptopropionic acid self-assembled monolayer for urea sensor

Dong-Hwa Yun, Min-Jung Song, Jong-Hoon Kim, Moon-Sik Kang, Nam-Ki Min, Suk-In Hong  
Korea University

**Abstract** - 바이오센서는 효소(enzyme), 생분자(biomolecule), 항체(antibody), 세포(cell) 등의 biological agent를 인지 물질(recognition material)로 하여 측정하고자하는 분석 대상(analyte)과 높은 선택성으로 반응유일시키게 하여 그 결과를 기존의 물리, 화학센서로 감지해내는 방식이므로 기존의 의료용 화학센서를 대체하는 추세이다.

바이오센서가 기존의 센서와 구별되는 점은 생물질의 선택적인 반응 및 결합을 이용하는 것이므로 바이오센서의 실용화에 있어서 가장 중요한 것은 생체 반응 물질의 고정화 기술과 고정화막의 선택이라 할 수 있다. 일정전압법을 이용한 요소센서는 많이 연구되어 오고 있으나 낮은 농도에서의 감도저하에 따른 단점으로 상용화에 이르지 못하고 있다. 본 논문은 요소센서의 이용하기 위한 고정화막으로 3-mercaptopropionic acid 자기조립 단일층의 전기화학적 특성을 고찰하였다.

자기조립 단일층은 직접적인 전자전달로 인하여 낮은 요소 농도에서 뛰어난 감도와 빠른 반응 시간을 보였으며, 특히 다공질 실리콘을 기질로 사용한 경우 평면 전극보다 약 3배의 감도 증가 효과를 가져왔다. 자기조립 단일층의 표면 분석은 X ray photoelectron spectroscopy(XPS)를 이용하였다.

1. 서 론

바이오센서의 고체 표면과 인지 물질 고정화 기술은 바이오 물질의 구조적 변형 억제와 표면에서 고유한 역할을 수행하기 위한 공간 확보의 두 가지 관점에서 많은 연구가 진행되고 있다[1]. 특히, 효소를 이용한 바이오센서는 고체 표면과 많은 결합을 할 수 있는 작용기로 인한 구조적 변형 및 입체장애에 의한 문제를 가지고 있다. 또한 흡착이나 entrapment 등의 물리, 화학적 방법을 이용한 고정화 기술은 효소가 가지는 활성자리의 배향을 일정한 방향으로 유지시키기 어려운 단점을 가지고 있다[2,3].

자기조립 단일층(self-assembled monolayer, SAM)은 분자간 강한 상호 작용(van der Waals interaction)으로 인해 조밀하고 안정한 단일층을 쉽게 얻을 수 있어 바이오 물질 고정화막 이외에도 부식 방지를 위한 보호막이나 반도체 공정의 패터닝을 위한 마스크로도 쓰인다. 최근에는 자기조립 단일층의 전기적 활성 특성을 이용한 전자 전달 메커니즘 연구와 트랜지스터의 게이트 물질로서 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[4,5].

본 논문은 요소센서에 적용하기 위해 평면 전극과 다공질 실리콘의 표면에 금 박막을 증착한 전극을 제작하였으며 각각 자기조립 단일층을 금 박막 상에 형성하여 전기화학적인 특성을 관찰하였다. 전극에 인가한 전압에 대한 전류 크기 변화는 순환전압전류법으로 고찰하였다. 요소의 농도에 따른 감도의 측정은 urease에 의해 분해된 요소의 양을 생성된 물의 전기분해로 발생하는 전류로 측정하는 간접적 방법인 시간대 일정전압법으로 고찰하였다.

2. 실 험

2.1 다공질 실리콘의 형성

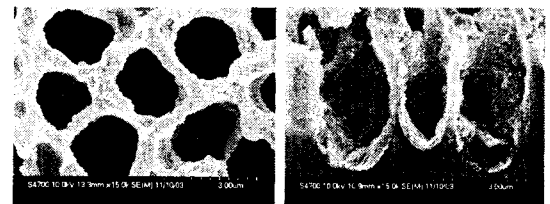
불순물로서 붕소가 도우핑된 비저항 14~17Ω·cm, (100), p-type 실리콘 웨이퍼를 실리콘 웨이퍼는 RCA 표준공정으로 세척한 후 작업전극(산화전극)으로 하여 전기화학적 방법으로 다공질 실리콘 층을 형성시켰다. 전해질 용액의 조성은 부피비로 H<sup>+</sup>(49%, CMOS grade, J. T. Baker) : C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH(95%, Ep, Daejung) : 2차 증류수 = 1 : 2 : 1 이었으며 고순도(99.99%)의 백금전극을 상대전극(환원전극)으로 사용하였다. 시간 300초, 전류밀도 -7mA/cm<sup>2</sup>의 일정 전류를 흘려주는 조건에서 다공질 실리콘 층을 형성시킨 결과 지름 2μm, 깊이는 약 10μm의 매우 균일한 다공질 실리콘 층이 형성되었다.

2.2 Au 및 Ag 박막 증착

작업전극으로 사용하기 위한 Au 전극은 다공질 실리콘 층에 형성된 산화막과 Au 사이의 접착력 향상을 위하여 underlayer로서 Ti를 약 200Å sputtering하고 2500Å의 Au를 evaporation 하였다. 이때 진공 챔버의 베이스 압력은 2 × 10<sup>-5</sup>mbar 였으며, photoresist를 이용한 패터닝 공정을 고려하여 기판의 온도는 100℃ 이하로 유지하였다.

작업전극의 패터닝은 AZ-1512 positive photoresist를 이용하였으며, 식각은 potassium iodide solution을 이용하였다. 그림1에 다공질 실리콘 위에 증착된 금 박막의 SEM 이미지를 보였다.

기준전극의 제작을 위한 Ag 박막의 증착은 underlayer로서 Ti를 약 200Å sputtering하고 2000Å의 두께로 evaporation 하였다. 금속 증착에 이어 약 400℃에서 2시간 동안 열처리 공정을 수행하였다.



(a) Top-view (b) Cross-sectional view  
그림 1. 다공질 실리콘에 형성된 금 박막 전극에 대한 SEM 이미지

2.3 자기조립 단일층의 형성과 urease 고정화

실리콘 웨이퍼 상에 증착된 금 박막 전극은 piranha solution (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=1:3)을 이용하여 80℃에서 약 5분간 세척하였다. 3 mercaptopropionic acid(2mmol/L,

ACROS) 용액에 약 12시간 담그어 자기조립 단일층을 형성하였다. 에탄올을 이용하여 충분히 세척한 후 NHS(3mmol/L, N-hydroxysulfosuccinimide, Sigma Chemical Co.)와 EDC(100mmol/L, 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]carbodiimide, Sigma Chemical Co.)의 혼합용액에 약 3시간 동안 담근다. 세척 후 sodium phosphate buffer 용액에 회색시킨 urease(EC 3.5.1.5, type III, from Jack Bean, Sigma Chemical Co.) 용액에 24시간 정도 담그어 자기조립 단일층과 효소의 공유결합을 형성하였다. 그림2에 urease의 고정화를 간략하게 나타내었다.

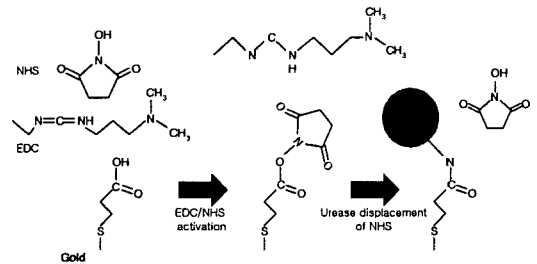
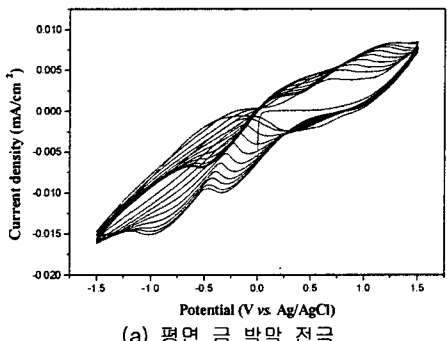


그림 2. 자기분자 단일층과 urease의 공유결합 반응 개략도

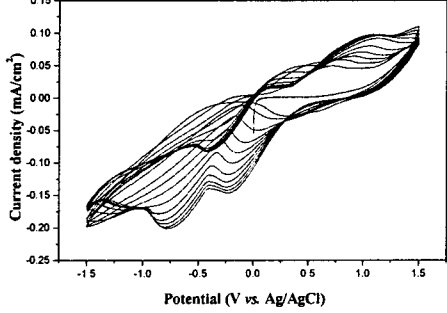
### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 작업전극의 전기화학적 고찰

Au 평면 전극과 다공질 실리콘을 기질로 하는 전극의 전류량을 순환전압전류법으로 고찰하였다. 기질의 구조적 차이로 인한 표면적 증가와 전류량 증가가 비례함을 볼 수 있다. 평면 전극일 때 보다 약 10배 정도의 전류량의 증가가 관찰되었다(그림 3).



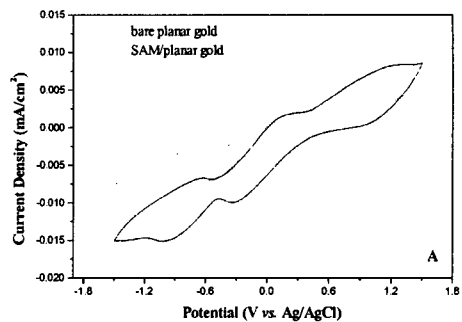
(a) 평면 금 박막 전극



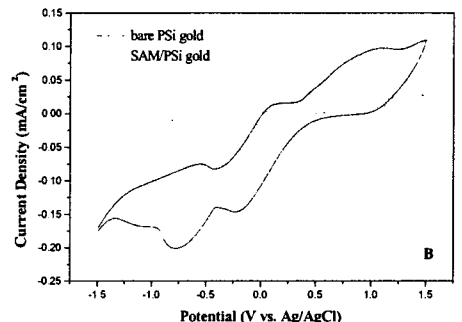
(b) 다공질 실리콘을 기질로 한 금 박막 전극

그림 3. Phosphate buffer 용액에서의 금 평면 전극과 다공질 실리콘을 기질로 한 전극의 순환전압전류곡선

그림 4는 금 박막 전극에 자기조립 단일층을 형성하여 얻은 순환전압전류 곡선이다. 단일층을 형성한 후 전류량이 떨어지는 것으로 보아 절연체로서의 특성을 관찰할 수 있다.



(a) 평면 금 박막 전극

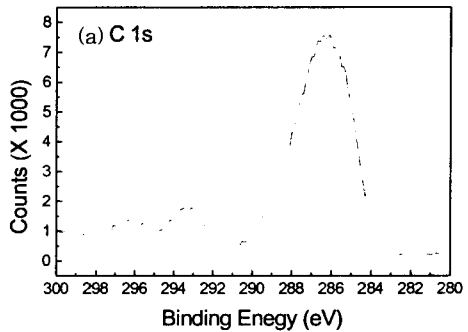


(b) 다공질 실리콘을 기질로 한 금 박막 전극

그림 4. Phosphate buffer 용액에서의 금 평면 전극과 다공질 실리콘을 기질로 한 전극 상에 자기조립 단일층을 형성한 후의 순환전압전류곡선

#### 3.2 효소 고정화 막의 표면 분석

효소가 고정화된 작업 전극의 표면을 X-ray photoelectron spectroscopy로 표면 분석하였다. 그림 5의 (a)는 C 1s 영역의 스펙트럼이며, 각각 탄소와 산소의 이중결합, 탄소-산소 단일결합, 탄소-탄소 단일결합을 나타내는 피크를 관찰할 수 있다. (b)는 O 1s 영역의 스펙트럼으로 각각 탄소-산소 이중결합, 탄소-산소 단일결합에 의한 피크이다. (c)는 N 1s 영역의 스펙트럼으로 폴리펩티드 체인의 아마이드 결합에 대한 질소의 결합 세기를 나타낸다. XPS 스펙트럼으로 urease와 자기조립 단일층이 공유결합을 이루고 있음을 알 수 있다.



(a) C 1s 영역의 XPS 스펙트럼

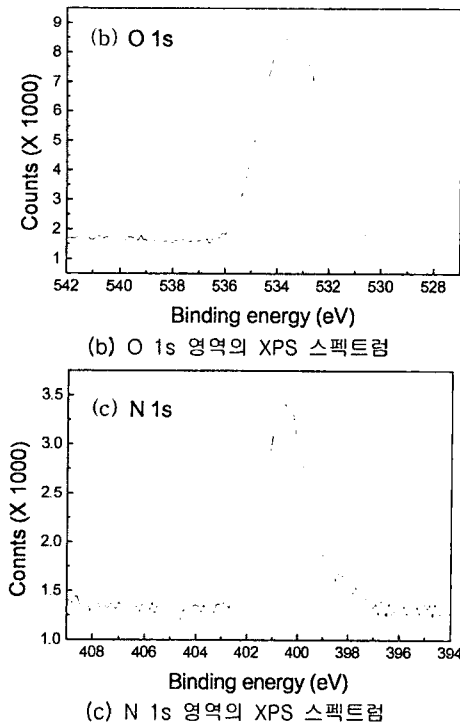


그림 5. Urease/SAM/Au/PSi 층의 XPS 스펙트럼. X-ray power, 2.5 kW; pass energy, 150 eV; TOA, 10°.

### 3.3 감도 측정

그림 6은 시간대 전류법에 의한 요소 농도에 따른 센서 전극의 감도를 나타낸 그래프이다. 요소 농도의 증가에 따라 확산한계전류 또한 증가함을 알 수 있다. 특히 감도의 90%가 되는 지점의 시간이 약 20초 이내로써 빠른 반응 시간을 보여주었다. 이때, 전해질 용액의 조성은 KCl 0.1mol/L, PBS 1mmol/L이며, 수소이온 농도 7.4, 인가 전압은 600mV로 하였다.

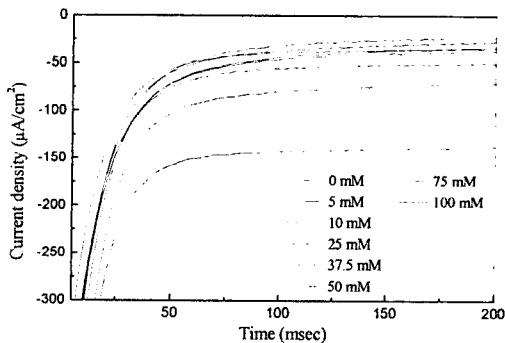


그림 6. 일정 전압(600mV) 하에 시간에 대한 세로토닌의 농도에 따른 전류의 변화

그림 7은 시간대 전류법에 의한 감도를 보정곡선으로 나타낸 것이다. 요소의 농도에 따라 확산한계전류가 선형적으로 증가함을 알 수 있다. 요소는 0 µmol/L~100 mmol/L의 범위에서 각각 농도별로 측정되었으며, Urease/SAM/Au/Porous Si(device 1)에서의 감도는 11.21 µA/mMcm<sup>2</sup>로 측정되었고, Urease/SAM/Au

Planar Si(device 2)에서의 감도는 4.39 µA/mMcm<sup>2</sup>로 측정되었다. device 1의 경우 device 2 보다 약 3배에 가까운 감도의 증가를 가져오는 것을 볼 수 있다.

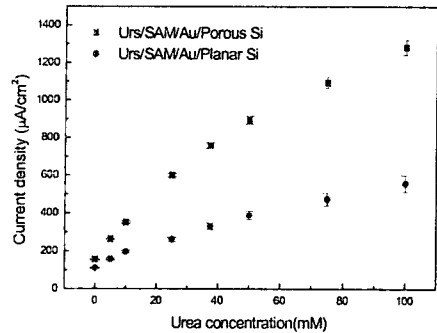


그림 7. 시간대 전류법에 의한 감도의 보정곡선

## 3. 결 론

본 연구에서는 반도체공정을 이용한 금 박막 전극을 제작하고 자기조립 단일층을 금 전극 위에 형성하였다. 자기조립 단일층은 urease를 고정화시키기 위한 막으로 이용되었으며, 전자 터널링 효과에 의해 20초 이내의 빠른 반응시간을 보였다. 각각의 기질을 다공질 실리콘과 평면 전극으로 달리 하였을 때 표면적의 증가 효과에 의한 감도가 약 3배 증가하는 것을 보였다. 바이오센서에 이용되는 자기조립 단일층은 취급의 용이성과 단백질과 고체사이의 안정한 결합을 이루며 균일한 분자 박막을 이룰 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 결합 할 수 있는 작용기가 많은 단백질의 경우 구조적 변형으로 단백질의 기능 상실 및 조밀한 쌓임으로 인한 입체장애효과 등의 단점을 보완하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-00591-0)지원으로 수행되었음.

## [참고 문헌]

- [1] Shaojun Dong, Jinghong Li, "Self assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42, 7 13, 1997
- [2] A.P.F. Turner, "Biosensor: Fundamentals and Applications", Oxford University Press, Oxford, 1989
- [3] Singhal, R., Gambhir, A., Pandey, M.K., Annapoorni, S., Malhotra, B.D., "Immobilization of Urease on poly(N vinyl carbazole)/steric acid Langmuir Blodgett films for application to urea biosensor", *Biosensor and Bioelectronics*, 17, 697-703, 2002
- [4] Habermuller, K., Mosbach, M., Schuhmann, M., "Electron transfer mechanism in amperometric biosensor", *Fresenius J. of Analytical Chemistry*, 366, 560-568, 2000
- [5] Kallury, K.M.R., Lee, W.E., Thompson, M., "Enhancement of the thermal and storage stability of urease by covalent attachment to phospholipid bound silica", *Analytical Chemistry*, 64, 1062-1068, 1992