

# 공진점변화검출용 QCM 센싱플랫폼을 이용한 폭발물 특이적 바이오수용체 성능평가

## Performance Evaluation of Explosive Specific Bio-receptor Using QCM Sensing Platform for Resonance Frequency Shift Detection

임 시 형\* · 정 현 진\*

Si-Hyung Lim and HyunJin Jeong

(2011년 2월 11일 접수 ; 2011년 3월 3일 심사완료)

**Key Words :** Quartz Crystal Microbalance(QCM), Explosive Detection(폭발물 검출), Dinitrotoluene(DNT), DNT Specific Binding Peptide(DNT 특이적 펩타이드)

### ABSTRACT

The mass change during the molecular interaction between explosive specific bio-receptors and target molecules has been measured using quartz crystal microbalance(QCM), which has a mass change detection limit up to  $\sim\text{ng}/\text{cm}^2$ . The environmental effect on the molecular interaction has been evaluated. In the liquid phase molecular interaction experiments, the high selectivity of the bio-receptor to DNT compared with toluene has been shown and the sensitivity for various concentrations of DNT has been demonstrated.

### 1. 서 론

환경 및 안전 문제에 대한 관심이 높아지면서 폭발물, 저위발성 및 휘발성 유기화합물을 고감도, 고선택적으로 감지하기 위하여, 마이크로/나노 크기의 초소형 센싱 소자를 이용하려는 노력이 활발히 진행 중이다<sup>(1,2)</sup>. 하지만, 초소형 센싱 소자를 이용한 검출 방법은 빠른 응답 특성과 민감도를 가지는 반면에 검출대상에 대한 선택성이 낮아지는 단점을 가지고 있다<sup>(3)</sup>. 최근에 바이오-폴리머 재료를 수용체로 사용하여 수용체와 목표 검출 물질 간의 다중결합을 통해 선택성을 획기적으로 높이려는 연구가 진행되고 있다<sup>(4)</sup>.

이 연구에서는 구조물의 기계적 공진점 변화량을

측정하여 수 나노 그램의 질량 변화까지 측정할 수 있는 공진형 압전 센서<sup>(5-7)</sup>인 QCM(quartz crystal microbalance)을 이용하여 수용체의 성능을 평가하였다. 수용체는 표면 고정된 dinitrotoluene(DNT) 유도체에 대해 파지디스플레이(phage display) 방식으로 스크리닝된 DNT에 선택적으로 반응하는 펩타이드를 이용하였다. 실험 환경 변화에 대한 반응신호를 측정하고, 펩타이드의 선택성 및 농도변화에 따른 신호를 측정하여 성능을 평가하였다.

### 2. QCM 센싱플랫폼구성

#### 2.1 폭발물 분자 검출용 QCM 센싱시스템

수정의 압전효과를 이용한 공진주파수 변화를 통해 질량 변화를 측정할 수 있는 QCM을 이용하여 수용체와 폭발물 분자 사이의 상호 작용에서 일어나는 반응신호를 측정하였다. QCM의 공진주파수 변화는 이론적으로 다음의 Sauerbrey의 수식을 통해

† 교신저자; 정희원, 국민대학교 기계시스템공학부  
E-mail : shlim@kookmin.ac.kr  
Tel : (02)910-4672

\* 국민대학교 대학원 기계설계학과

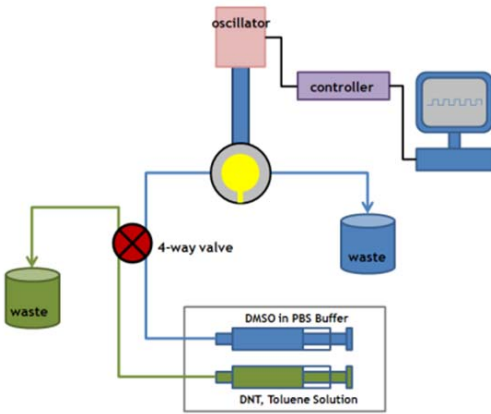


Fig. 1 Schematic diagram of QCM sensing platform

정의 된다<sup>(8)</sup>.

$$\Delta f = -C_f \Delta m \quad (1)$$

여기서  $C_f = 2nf_0^2 / \sqrt{\rho_q \mu_q}$ 로 정의되고,  $n$ 은 작동되는 크리스탈의 개수,  $f_0$ 는 사용된 QCM칩의 공진주파수(5 MHz),  $\rho_q$ 는 수정의 밀도(2.648 g/cm<sup>3</sup>),  $\mu_q$ 는 수정의 강성율(shear modulus of quartz: 2.947 × 10<sup>11</sup> g/cm·s<sup>2</sup>)이다. 이 연구에서는 한 개의 QCM에 수정 한 개를 사용하였으므로  $n$ 의 값을 1로 정하고 나머지 값을 식 (1)에 대입하여 계산하면  $C_f = 56.6$  Hz/μg·cm<sup>2</sup>을 얻을 수 있다. 또한,  $\Delta m$ 은 단위 표면적당 질량 변화(g/cm<sup>2</sup>)이다.

폭발물 분자를 검출 하는 수용체의 성능 평가를 위해 Stanford Research Systems사의 QCM200 장비와 Q-sense사의 Q-sense E4를 사용하였다. Q-sense E4는 1차 모드만 감지할 수 있는 QCM200 장비와 달리 1차(5 MHz)에서 13차(65 MHz) 모드까지 측정이 가능하다. 또한, 온도제어가 가능하여 액상실험에서 나타날 수 있는 온도변화에 대한 신호의 불안정성을 줄일 수 있다. 액체상에서 수용체의 선택성 및 농도별 반응성 측정시에는 신호측정의 안정성 향상을 위해 QCM200 대신 Q-sense E4 장비를 사용하였다. Fig. 1은 구성한 QCM 센싱시스템의 개략도이다.

### 2.2 펩타이드의 금 표면 고정화 절차

습도 및 안정화, 선택성 실험 등을 진행하기 위해서 QCM 금 표면에 펩타이드를 고정화하는 것이

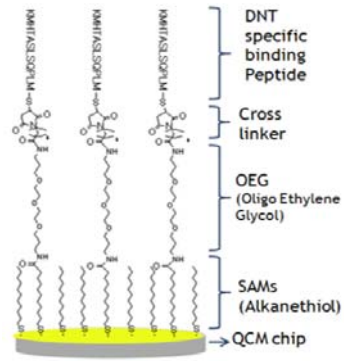


Fig. 2 QCM chip coated with DNT specific peptide

필요하다. 펩타이드 시퀀스의 시스테인기를 이용하여 금 표면에 바로 코팅하는 방법<sup>(9,10)</sup>과 자기조립 단일층(self-assembled monolayer; SAM), Oligo ethylene glycol(OEG), cross linker를 차례대로 금 표면에 부착한 뒤 마지막으로 펩타이드를 연결하는 방법을 이용하였다. UV cleaning, NaOH, DI water를 이용하여 클리닝을 실시한 후, 2 mM의 1-dodecanthiol과 1 mM의 11-mercaptoudecanoic acid를 혼합한 용액에 12 시간이상 방치하여 SAM을 형성한다. 물과 에탄올을 섞어 세척한 후, 2 mM의 4,710-trioxa-1, 13-tridecanediamine 수용액을 만들어 12시간 동안 담가두면 OEG가 코팅된다. Dime- thylsulfoxide(DMF)에 N-(γ-maleimidobutyryloxy)succinimide(GMBS)를 녹이고 DI water에 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide hydrochloride (EDC)를 녹여 각각 2 mM의 용액으로 만든 뒤 섞어 QCM 칩을 2 시간 동안 담구어 cross linker를 코팅한다. 그 후, PBS buffer에 녹인 0.1 mM의 펩타이드 용액에 24 시간 동안 담구어 펩타이드를 연결한다. Fig. 2는 최종적으로 QCM 금 표면에 펩타이드가 코팅된 모습이다.

## 3. 폭발물 특이적 수용체의 환경 안정화 실험

### 3.1 용액에 따른 안정화 실험

액상실험 시 사용될 용액에 따른 안정화 실험을 실시하였다. 실험 용액은 에탄올과 PBS buffer로써 같은 조건에서 안정화 도달 정도를 비교하였고, 금 표면에 직접 펩타이드를 코팅한 칩을 이용하였다.

각각의 실험은 QCM200 장비를 사용하였고, PBS buffer와 에탄올을 Syringe 펌프에 장착하여 0.05 standard cubic centimeter per minute(sccm)의 유속으로 흘려주고 온도 23 °C, 실내습도 19 %의 조건에서 70분간 진행하였으며, 60분 동안 용액을 흘려주고 10분 동안의 안정화 도달 정도를 비교하였다. Fig. 3은 측정된 10분 동안 공진점 변화(1차 모드)의 안정화 결과를 보여준다. 그래프와 같이 에탄올은 60분이 지난 후에도 정상 상태에 도달하지 못하고 공진주파수가 약 2 Hz 정도 감소하고 있으나 PBS buffer는 변화폭이 약 0.5 Hz 내외로 안정적으로 정상상태에 도달하였다고 파악할 수 있다. 이는 PBS buffer의 비열(1 cal/g·°C) 보다 에탄올의 비열(0.58 cal/g·°C)이 낮아서 액상에서 온도에 민감하게 반응하는 QCM에 영향을 끼친 것으로 파악된다.

**3.2 OEG의 유무에 따른 안정화 실험**

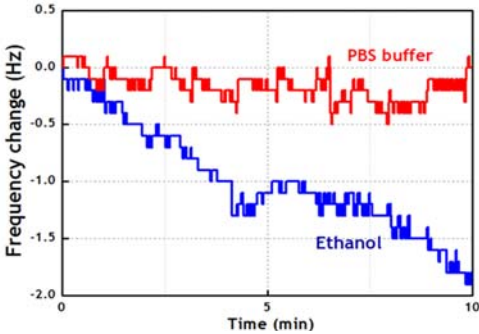
펩타이드의 성능을 평가하는 실험 시에 최적의 조건을 알아내기 위해, SAM, OEG 층과 함께 코팅

된 펩타이드와 금 표면에 직접 코팅된 펩타이드를 같은 환경에서 안정화 정도의 비교 실험을 실시하였다. QCM200 장비를 이용하였고, 유속 0.05 sccm의 PBS buffer를 사용하였으며 40분 동안 PBS buffer를 흘려준 뒤, 10분 동안 안정화되는 신호를 측정하였다. 실험 시에 실내는 온도 23 °C, 습도 19 %의 조건을 유지시켰다. 각각의 실험결과를 비교한 공진점 변화(1차 모드)의 그래프는 Fig. 4와 같다. OEG와 펩타이드를 함께 코팅을 실시한 칩의 경우, 노이즈의 범위가 0~0.1 Hz 이내로 매우 안정적으로 반응하고 있는 것을 확인할 수 있다. 반면, 금 표면에 펩타이드를 직접 코팅한 경우는 용액을 흘려주는 40분이 지난 시점에도 정상상태에 도달하지 못하고 10분 동안 주파수가 약 14 Hz 정도의 큰 폭으로 상승하고 있는 것을 확인할 수 있다. OEG를 펩타이드와 같이 칩에 코팅하였을 경우 액상실험을 실시할 때 펩타이드의 안정도를 높일 수 있음을 알 수 있다.

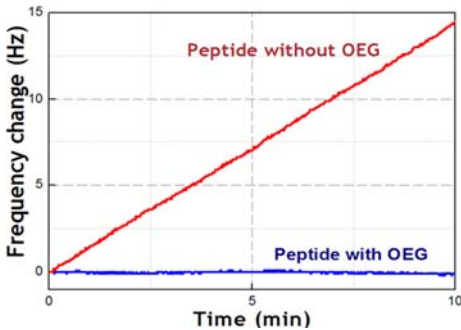
**4. DNT 분자검출**

**4.1 습도실험**

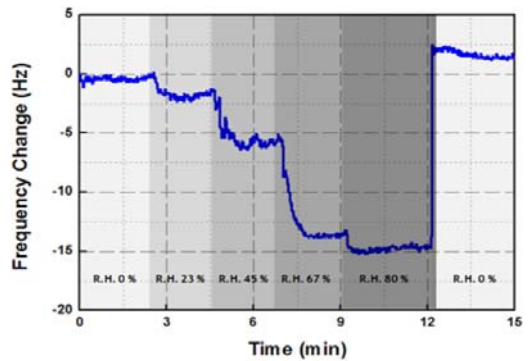
DNT에 특이적으로 반응하는 펩타이드의 습도에 대해 일어나는 반응패턴을 분석하였다. 금 표면에 SAM, OEG, cross linker, 펩타이드를 차례대로 코팅한 칩을 사용하였다. QCM200 장비를 이용하였으며, 유속은 200 sccm으로 고정하였다. Fig. 5는 펩타이드의 습도에 대한 반응의 공진점 변화(1차 모드) 그래프이다. 펩타이드가 코팅된 칩은 상대습도 80 %에서 최대주파수 변화인 약 15 Hz를 보이고 있다.



**Fig. 3** Stabilization comparison between PBS buffer and ethanol solutions



**Fig. 4** Stabilization comparison for OEG



**Fig. 5** Humidity response of DNT specific peptide

또한 상대습도가 증가함에 따라 주파수변화도 증가하는 모습을 보이지만 습도가 67%에서 80%로 변화할 때 약 1 Hz의 작은 변화만을 보인다. 이는 상대습도가 약 67%에 도달하였을 때 이미 펩타이드가 습도에 의해 포화상태에 도달했다고 볼 수 있다.

#### 4.2 선택성 실험

펩타이드가 DNT에 선택적으로 반응하는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 검출대상물질은 DNT와 톨루엔(toluene)을 이용하였고 농도는 0.55 mM로 제조하여 사용하였다. 용매는 펩타이드의 활성을 원활하게 돕기 위하여 dimethylsulfoxide(DMSO)를 5% 섞어 제조한 PBS buffer를 사용하였다. Q-sense E4 장비를 이용하였으며, 실내습도 19%, 실내온도 25 °C의 환경에서 진행하였으며 유속은 0.1 sccm으로 유지하였다. PBS buffer를 칩에 흘려주어 신호가 정상상태에 도달하게 한 후, DNT 및 톨루엔이 섞여 있는 PBS buffer로 바꾸어 흘려주었다. 또한, 반응이 충분히 일어난 13분 후에 다시 PBS buffer로 바꾸어 흘려주어 신호가 회복되는지 확인하였다. Fig. 6는 실험 결과의 공진점 변화(3차 모드)를 나타낸 그래프로서 0.55 mM의 농도에서 톨루엔에 대한 DNT의 선택성 실험 결과를 보여준다. 실험에서, 3차 모드가 1차 및 다른 고차 모드에 비해 보다 안정적인 신호를 보여주었다. 검출 대상물질이 녹아 있는 용액으로 바꾼 뒤 약 2분 후에 반응이 일어나고, 약 10분 동안 그 상태가 유지됨을 알 수 있다. 다시 PBS buffer를 흘려주었을 때, 주파수 신호가 거의 처음 수준으로 회복되는 것을 볼 수 있다. 톨루엔과 DNT의 반응에 의한 주파수 변화량을 비교해보면 톨루엔의 경우 0.3 Hz로 적은 변화량을 보인 반면, DNT의 경우 1 Hz의 변화폭을 보여 톨루엔에 비해 큰 폭으로 변화하는 것을 알 수 있다. 이 변화폭을 고려해볼 때, 펩타이드가 DNT에 대해 톨루엔에 비해 좋은 선택성을 가지고 있음을 알 수 있다.

#### 4.3 농도별 실험

펩타이드의 민감도 정도를 확인하기 위하여 농도별 실험을 실시하였다. Q-sense E4 장비를 이용하여 0.137, 0.275, 0.55, 1.1 mM의 DNT를 반응시켰을 때 나타나는 주파수 변화량을 비교하였다. 실험은 선택성 실험과 동일한 방법으로 진행하였으며, SAM,

OEG, cross linker, 펩타이드가 순서대로 코팅된 칩을 사용하였다. 선택성 실험과 같이 DNT가 녹아 있는 용액을 반응시키자 약 3분 후에 반응이 일어나고 그 뒤 약 10분에 걸쳐 신호가 유지되는 것을 확인하였다. 10분이 지난 후 다시 PBS buffer로 바꾸어 주었을 때 신호가 처음과 같은 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 7은 0~1.1 mM의 DNT 농도 변화에 따른 주파수 변화량을 나타낸 그래프이다. 그래프에서 나타난 바와 같이 0~0.55 mM의 농도변화 구간에서는 비교적 선형적으로 상승하지만, 0.55~1.1 mM의 구간에서는 기울기가 완만한 것을 확인할 수 있다. 선형적으로 상승하던 그래프의 기울기가 1.1 mM의 구간으로 갈수록 완만해지는 것을 볼 때 펩타이드와 DNT의 반응이 점차 포화되는 것을 추측할 수 있다. 또한, 그래프에서 선형적인 변화를 보인 0~0.55 mM의 구간을 분석해 본 결과, 펩타이드의

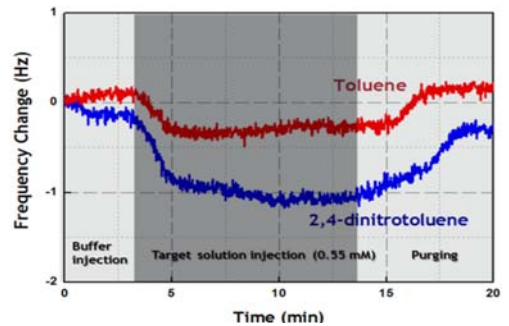


Fig. 6 Molecular binding interaction comparison between 0.55 mM DNT and toluene in PBS buffer

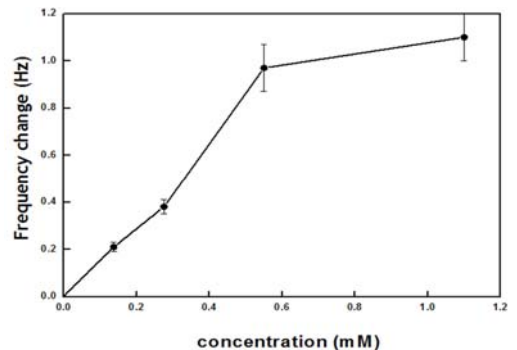


Fig. 7 Molecular binding interaction responses for various dinitrotoluene concentrations from 0.137 mM to 1.1 mM

DNT 반응에 대한 QCM 센서플랫폼의 민감도가 1.7 Hz/mM인 것을 알 수 있었다.

### 5. 결 론

이 연구에서는 DNT에 선택적으로 반응하는 펩타이드의 성능을 QCM을 이용하여 평가하였다. DNT와 펩타이드의 반응을 공진주파수 변화 측정을 통하여 검출할 수 있는 QCM 장치를 구성하고 환경의 영향에 따른 신호변화를 검출하였다. 펩타이드는 실험에 사용하는 용액에 따라 다른 신호변화를 보이며 에탄올보다 PBS buffer를 솔루션으로 사용하여 실험할 때 안정적인 신호를 보였다. 또한, QCM의 금표면에 펩타이드를 직접 코팅하였을 때보다 OEG를 코팅하고 펩타이드를 코팅하였을 때 안정적인 신호를 보였다.

펩타이드와 DNT 간의 반응에 의한 성능을 평가하기 위하여 습도에 의한 영향, 선택성, 농도에 따른 반응량을 측정하였다. 펩타이드는 습도가 증가함에 따라 공진주파수가 떨어지는 경향을 보였으며, 상대습도 66~80%에서 포화 상태에 이르는 경향을 보였다. 선택성 실험결과 펩타이드는 DNT에 대하여 톨루엔에 비해 비교적 강한 선택성을 가지는 것을 알 수 있었으며, DNT의 농도의 변화에 따른 반응을 측정한 결과 DNT의 농도가 증가함에 따라 신호 변화량이 커지는 경향을 볼 수 있었고, 펩타이드의 DNT에 대한 검출민감도가 1.7 Hz/mM 수준임을 측정할 수 있었다.

### 후 기

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2008-331-D00057)과 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 휴먼인지환경사업본부-신기술융합형 성장동력사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2010K001148).

### 참 고 문 헌

(1) Lim, S. H., Horowitz, R. and Majumdar, A., 2006, Modeling and Performance of Two Types of Piston-like Out-of-plane Motion Micromechanical

Structures, Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol. 16, No. 7, pp. 1258~1266.

(2) Lim, S. H., Raorane, D., Satynarayana, S. and Majumdar, A., 2006, Nano-chemo-mechanical Sensor Array Platform for High-throughput Chemical Analysis, Sensors and Actuators B, Vol. 119, No. 2, pp. 466~474.

(3) Raorane, D., Lim, S. H. and Maumdar, A., 2008, Nanomechanical Array to Investigate the Selectivity of Binding Interactions between Volatile Benzene Derivatives, Nano Letters, Vol. 8, No. 8, pp. 2229~2235.

(4) Jaworski, J., Raorane, D., Huh, J. H., Majumdar, A. and Lee, S. W., 2008, Evolutionary Screening of Biomimetic Coatings for Selective Detection of Explosives, Langmuir, Vol. 24, No. 9, pp. 4938~4943.

(5) Lu, C., 1975, Mass Determination with Piezoelectric Quartz Crystal Resonators, Journal of Vacuum Science Technology, Vol. 12, No. 1, pp. 578~583.

(6) QCM 200 Quartz Crystal Microbalance Service Manual, Stanford Research Systems.

(7) Lim, K. L., Kim, E. J., Kang, J. S. and Park, H. W., 2008, Spectral Element Formulation for Analysis of Lamb Propagation on a Plate Induced by Surface Bonded PZT Transducers, Transactions of the Korea Society for Noise and Vibration Engineering, Vol. 18, No. 11, pp. 1157~1169.

(8) Sauerbrey, G., 1959, Use a Quartz Vibrator from Weight Thin on a Microbalance, Journal of Physik, Vol. 155, pp. 206~210.

(9) Tseng, M., Chang, Y. and Chu, Y., 2007, Quantitative Measurements of Vancomycin Binding Self-assembled Peptide Monolayers on Chip by Quartz Crystal Microbalance, Analytical Biochemistry, Vol. 371, No. 1, pp. 1~9.

(10) Okada, T., Yamamoto, Y., Miyachi, H., Karube, I. and Muramatsu, H., 2007, Application of Peptide Probe for Evaluating Affinity Properties of Proteins Using Quartz Crystal Microbalance, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 22, No. 7, pp. 1480~1486.