

형광 나노 실리카 입자의 제조

나영주, 김종성*
 경원대학교 화학생명공학과
 (jskim@kyungwon.ac.kr*)

Fabrication of fluorescent nano silica particles

YoungJoo Na, JongSung Kim*
 Department of Chemical & Bioengineering, Kyungwon University
 (jskim@kyungwon.ac.kr*)

서론

실리카는 바이오물질 분석에 사용하는데 여러 가지 장점을 가지고 있다. 실리카는 다양한 방법으로 합성이 가능하여 나노입자, 투명박막 또는 후막으로 만들 수 있다. 실리카 합성은 표면의 화학특성에 따라 결정되며, 이는 표면에 존재하는 silanol이나 siloxane에 영향을 받게 된다. silanol중 hydroxy group은 여러 화합물들과 반응하여 amine, carboxyl, thiol group 등을 형성하여 다양한 종류의 silica-유기 화합물을 만들 수 있다. 또한 avidin과 같은 분자의 passive adsorption에 의해서도 표면개질이 가능하다. 이러한 다양한 합성 또는 표면개질 방법에 의해 바이오물질분석에 유용하게 응용될 수 있다.[1]

형광나노입자는 바이오산업이나 정보산업에서 indicator나 광원으로 매우 유망하여, 바이오 이미징, 바이오칩, 바이오센서, 어레이어 등에 그 활용성이 높다.[2] 하지만 상기 분야에서 실용화하기 위해서는 제조된 입자가 DNA, 단백질, 항체 등의 바이오물질과 결합이[2,3] 가능해야 하며 mono disperse한 크기로 조절이 되어야 한다.

Core-shell 구조의 유기-실리카 형광체는 실리카의 표면화학을 응용한 바이오물질과의 접합성이 용이하고, metal-organic 구조에서 발광체의 photobleaching현상을 줄여줄 수 있을 것으로 기대되어 그 개발이 매우 필요하다고 하겠다.[4] 또한 도핑된 유기형광물질의 종류에 따라 다양한 파장대의 형광체의 제조가 가능할 것으로 보이며, DNA, 단백질 등 바이오입자들과 결합에 의해 유전자 발현, high throughput screening, 질병진단 등에 사용될 것으로 기대된다.[5]

본 연구에서 개발될 형광나노입자는 단백질이나 세포의 표지자로 또는 항원항체검출이 가능하다. 매우 작은단위의 유기형광물질을 실리카에 도핑하여 core-shell구조의 나노입자를 만들 수 있다. 수용성의 실리카가 코팅된 형광물질은 silica chemistry의 다양성에 힘입어 바이오분석에 매우 유용할 것으로 예상되고 있다.

실험 방법과 분석

본 연구에서는 DNA 또는 단백질 등의 표지자로 사용 가능한 유기-실리카 형광 나노입자를 제조하였다. 일차적으로 형광 유기체로 dye rich core 물질을 만들고 sol-gel법에 의해 실리카가 이를 둘러 쌓는 core-shell 구조체를 만들었다. Fig 1은 본 실험에서 사용된 Fluorescein-5-maleimide와 (3-Mercaptopropyl)Triethoxysilane (MPTS)과의 반응을 보여준다.

형광 현상을 보이는 유기 염료 분자(DMACA)를 에탄올에 녹인 후 silica 전구체(MPTS)를 가하여 12시간동안 dark glove box안에서 교반시켜 공유결합된 유기물-실리카 dye-rich core 물질을 만든다. 다음에 TEOS, H₂O, NH₄OH를 주입하여 dye-rich core 물질의

methoxysilane 과 sol-gel 반응을 통하여 외부에 실리카 shell을 형성하게 된다. 이때 NH_4OH 는 sol-gel반응의 촉매 역할을 하게되며, hydrolysis 및 condensation 반응에 의해 형성되는 외부 실리카 네트워크 shell은 광화학적 안정성에 치명적인 용매 상호 작용을 shielding하는 역할을 하게 된다. Fig 2는 염기성분위기 하에서 반응이 일어나는 것을 보여준다.

본 연구에서 제조된 dye-silica 나노입자는 산화방지와 응집의 영향을 고려하여 알루미늄 포일로 빛을 차단한 채로 상온에서 용매에 보관 후 DLS(BIC)로 사이즈를 측정하였으며 전자현미경 (FESEM)을 통해 입자들의 이미지를 관찰하였다. 제조된 입자의 형광 스펙트럼 분석에 의해 제조된 입자의 형광 특성을 평가하였다.

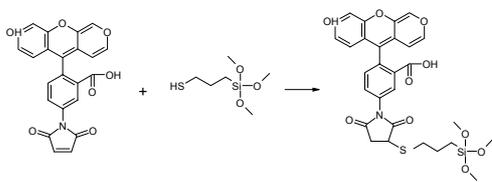


Fig 1. Schematic diagram of dye-silica nano particle synthesis.

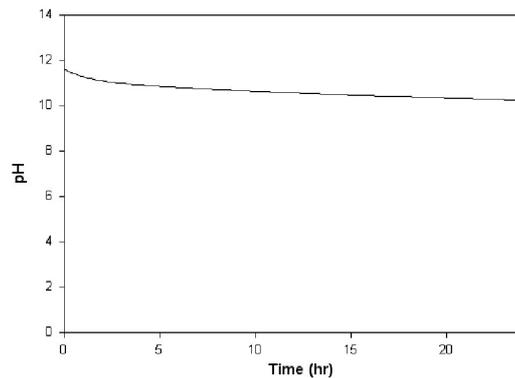


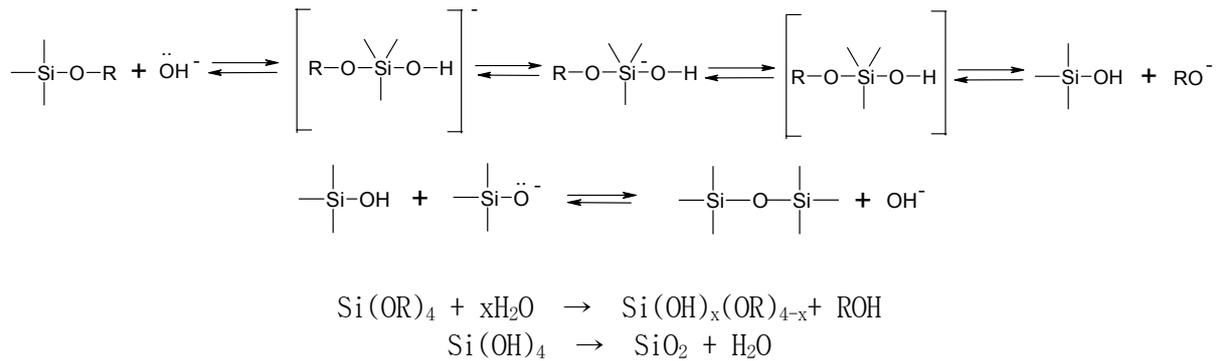
Fig 2. pH values as a function of time

결과 및 고찰

(1) 나노입자의 합성

Fluorescein-5-maleimide를 ethanol과 THF 용액상에서 MPTS와 반응시켜 dye-rich core 물질 및 core-shell 구조의 유기 형광염료-silica 화합물을 합성하였다. THF를 용매로 사용한 경우는 입자들의 cluster 형성으로 인한 불균일한 size distribution을 야기하여 용매로서 에탄올을 사용하였다.

형광염료인 Fluorescein-5-maleimide가 MPTS의 메르캅토기와 결합하면서 core를 만든다. 만들어진 core에 실리카전구체가 염기성촉매에 의해서 가수분해가 일어난다. 이는 알콕사이드의 실리카 전구체로 사용하는 sol-gel 반응은 산소가 -OH 친핵체 (nucleophile)를 밀어내며 Si-O-Si결합을 만드는 반응을 한다. 가수분해 과정이 일어나면 다음번 알콕사이드 그룹들이 그 전보다는 쉽게 monomer에서 떨어져 나와 후속 반응들이 차례로 일어나게 된다. 그러므로 가수분해가 많이 된 실리컨들은 더욱 쉽게 반응이 일어나게 된다. 염기성조건 하에서의 가수분해는 느리지만 완전하고도 비가역적인 가수분해가 일어나게 된다.



(2) 나노입자의 사이즈 분석

Fig 3은 합성된 염료-silica 나노입자의 size distribution을 보이는 DLS 분석 결과이다. 그림에서 입자는 40 - 87 nm 사이의 분포를 보이며 평균직경이 53.9 nm이고, polydispersity는 2.35X10⁻²로 비교적 고른 분산도를 보인다. 온도는 25°C의 조건으로 측정하였다.

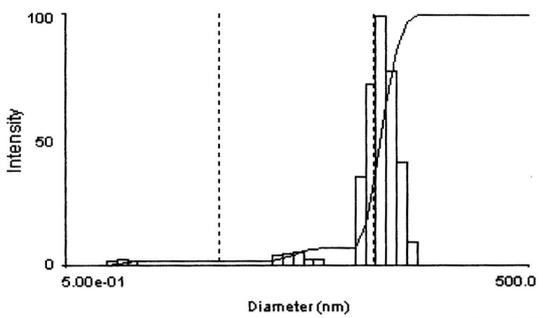


Fig 3. DLS graph

Fig 4는 core-shell 구조의 dye- silica 나노입자의 SEM 사진을 보여준다. 그림에서 합성된 실리카 입자들이 결합하여 cluster를 형성하는 것을 보인다. 따라서 나노 사이즈의 실리카 입자를 사용하기 위해서는 제조된 입자들의 분산 기술이 매우 중요함을 알 수 있다. 그림 (b)의 경우는 THF 용매에 분산된 나노입자를 pipeting하여 유리기판에 떨어뜨린 후 drying 하여 찍은 SEM 사진이다. 그림 (a)에 비해 나노 입자가 독립적으로 존재하며 사이즈는 DLS 실험 결과와 동일한 것을 보여주고 있다. 제조된 나노입자의 형광특성은 형광염료 및 dye-rich core와 core-shell nano particle을 각각 fluourescent spectroscopy에서 scanning하여 상대적인 fluourescent intensity를 비교하여 조사하였다.

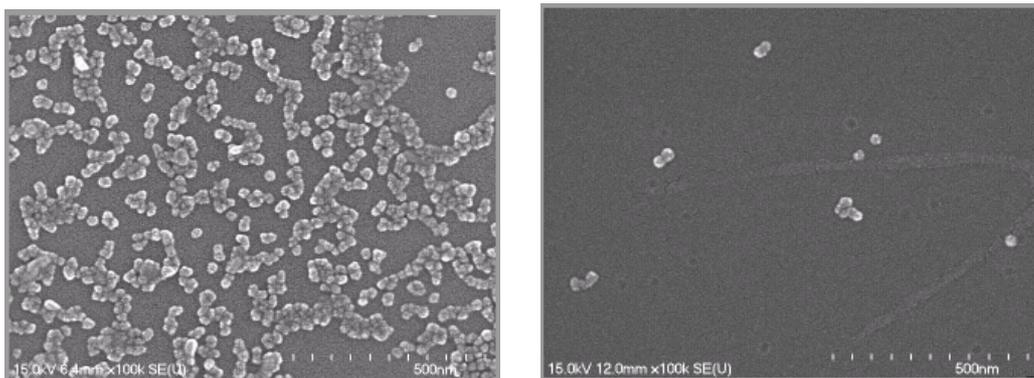


Fig 4. The resultant 50nm particles as characterized by Scanning Electron Microscopy(SEM).

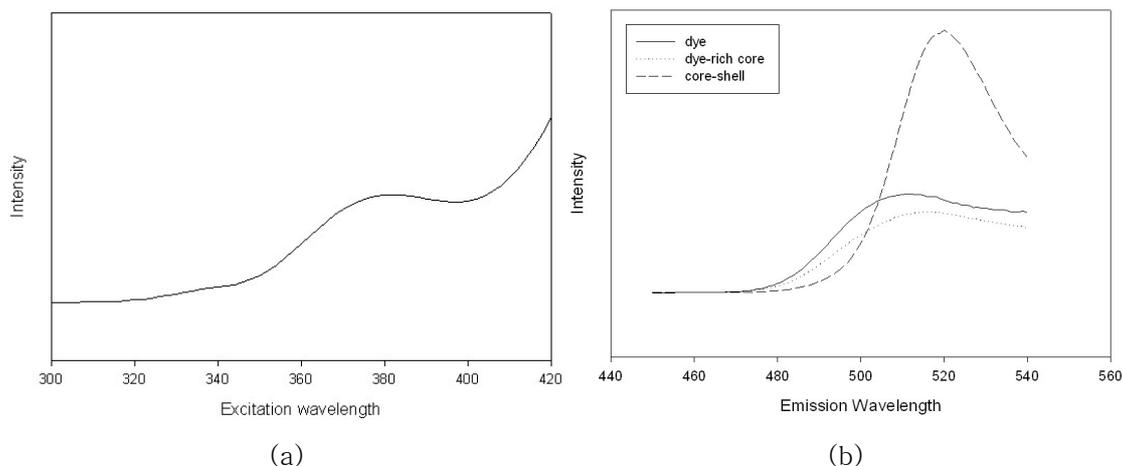


Fig 5. (a) Excitation spectra of fluorescein-5-maleimide at 520nm emission filter (b) Emission spectra of nanoparticle intermediates

Fig 5의 (a)는 PTI사의 excitation monochromator와 올림푸스사의 520nm emission filter를 조합하여 여기파장을 스캔하여 얻은 형광스펙트럼이다. 여기파장이 380nm 일 때 최대 형광이 일어남을 알수 있다. 부근을 보면 형광이 일어나는 것으로 보여진다. (b)는 제조된 나노 입자들의 형광스펙트럼을 보여준다. 여기파장을 380nm로 고정하고 측정파장 스펙트럼을 측정하였다. 그림에서 형광 dye인 Fluorescein-5-maleimide에 silane 화합물을 공유 결합시켜 dye-rich core 구조로 만들면 형광 intensity가 떨어지지만 sol-gel 용액을 가하여 silica network을 형성하여 dye-silica의 core-shell 구조로 만들게 되면 형광 intensity가 증가함을 보여준다. core-shell 구조의 dye-silica의 형광 intensity 향상은 shell 내부에 있는 형광 dye의 형광 효율 향상에 기인한다. 또한 shell 구조의 silica는 특히 수용액속의 산소 원자에 의한 형광특성 감도 저하를 막아 줄 뿐만 아니라, 형광 dye에서 종종 발생하는 photo bleaching 효과도 현저히 개선될 수 있음이 보고 되고 있다. 따라서 본 연구에서 합성한 형광 나노 실리카 입자는 형광 효율이 본래의 형광염료에 비해 매우 높으며, photo bleaching 현상이 개선되어 DNA, 단백질, cell 관찰 등에 응용이 기대된다.

참고문헌

- [1] G.A.Lawrie, B.J.Battersby, M.Trau, Appl.Nanosci. 1(1) (2004) 17.
- [2] Cao YC, Jin R, Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA, Roman dye-labeled nanoparticle probes for proteins, JACS, 125(2003) 14676.
- [3] S. Wang, N.Mamedova, Nicholas A.Kotov, W.Chen, J.Studer, Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates, Nano Lett., 2,8(2002) 817.
- [4] Marcel Bruchez Jr.,Mario Moronne, Peter Gin, Shimon Weiss, A. Paul Alivisatos, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, Science, 281(1998) 2013.
- [5] Hooisweng OW, Daniel R. Larson, Mamta Srivastava, Barbara A. Baird, Watt W. Webb, Ulrich Wiesner, Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles, 5,1(2005) 113.

감사의 글

이 연구는 경기도에서 지원하는 경기도지역협력연구센터사업에 의해 이루어졌다.