

## 다채널 표면 플라즈몬 공명 영상장치를 이용한 자기조립 단분자막의 표면 분석

표현봉<sup>1</sup>, 신용범<sup>2</sup>, 윤현철<sup>3</sup>

<sup>1</sup>한국전자통신연구원 반도체.원천기술연구소, <sup>2</sup>한국생명공학연구원  
융합생명공학연구실, <sup>3</sup>아주대학교 화학생명공학부

<sup>1</sup>전화: (042) 860-5556, FAX: (042) 860-6836, e-mail: pyo@etri.re.kr

### Abstract

Multi-channel images of 11-MUA and 11-MUOH self-assembled monolayers were obtained by using two-dimensional surface plasmon resonance (SPR) absorption. Patterning process was simplified by exploiting direct photo-oxidation of thiol bonding (photolysis) instead of conventional photolithography. Sharper images were resolved by using a white light source in combination with a narrow bandpass filter in the visible region, minimizing the diffraction patterns on the images. The line profile calibration of the image contrast caused by different resonance conditions at each points on the sensor surface (at a fixed incident angle) enables us to discriminate the monolayer thickness in sub-nanometer scale. Furthermore, there is no signal degradation such as photo bleaching or quenching which are common in the detection methods based on the fluorescence.

### 1. 서론

최근 들어 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance; SPR), 표면 강화 형광(Surface Enhanced Fluorescence; SEF) 등 강화된 전자기장 내에서의 단백질, 효소, 그리고 핵산의 결합, 분리를 정량화 하려는 노력은 DNA 칩 혹은 단백질 칩의 제작과 측정 시스템에 있어서 측정 한계(Detection limit)를 피코 몰( $10^{-12}$  M) 혹은 그 이하로 낮추고자 하는 노력과 관련하여 큰 관심을 끌고 있다. 특히 기존의 단일 채널에 있어서의 분자 결합을 측정하는 것에서 벗어나, 한 번에 여러 시료를 동시에 측정하고자 하는 다중 채널 측정(Multiple channel detection), 즉 여러 종류의 DNA나 항체 등의 단백질을 기관 상에 고정화하여, 결합하는 염기쌍 혹은 항원의 종류와 결합 정도를 한 번에 알아 낼 수 있는 다중 채널 DNA칩이나 단백질 칩에의 응용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>1</sup>. 한편 금속과 유전체의 계면에서 양자화된 전자의 요동, 즉 표면

플라즈몬의 공명 흡수를 이용하여 유전체 표면에 있어서의 굴절률 변화를 관찰함으로써 분자 사이의 결합(Adsorption)과 분리(Desorption)를 정량적으로 측정하는 것은 여러 면에서 유리한 점을 갖고 있다. 먼저, 통상 면역센서(Immunosensor)나 DNA/단백질 칩에서 가장 흔히 이용하는 형광법과 같이 측정하고자 하는 시료(Target molecule)에 형광체를 붙여야 하는 번거로움이 없고(Non-labeling method), 강화된(enhanced) 전자기장은 금속-유전체의 경계면에서 지수적으로 감소함으로써 표면의 변화에 매우 민감하며, 또한 분자간의 결합/분리를 실시간으로 측정하여 그의 Kinetics를 관찰 할 수 있는 등의 장점이 있다. 본 논문에서는 위와 같은 표면 플라즈몬 공명의 특성과 장점을 고려하여 다채널의 표면 플라즈몬 이미징 시스템을 구현하고, 이의 측정 한계를 검증하기 위하여 11-MUA(11-Mercaptoundecanoic acid), 11-MUOH(11-Mercaptoundecanol) 등 자기조립 단분자막을 금속(Au) 박막이 코팅된 기판 위에 패터닝 하였다. 이의 이미징을 위해서는 프리즘을 이용한 내부 전반사(Total Internal Reflection; TIR) 방법, 즉 프리즘 커플러를 이용하여 소산파를 유도하는 Kretschmann 방법을 이용하여 그의 반사율의 변화를 CCD카메라로 측정하였다. 이론적인 예측을 위하여 적층된 임의의 갯수의 유전체 및 금속 박막의 광특성을 계산할 수 있는 다중 Fresnel 방정식을 전산모사(Simulation) 하여 금 표면 위에 자기조립 단분자 막을 비롯한 유전체 막이 코팅되었을 때의 반사율을 구하였다. 그리고 11-MUA 및 11-MUOH의 입사각에 대한 공명 흡수 조건의 변화를 측정하여 다채널 영상으로부터 명암의 차이의 보정을 가능하게 하였다. 이로부터 센서 표면에서의 두께 변화에 대한 해상도는  $\text{\AA}(10^{-8} \text{ cm})$  정도 이하임을 알 수 있었다.

## 2. 재료 및 방법

패터닝 된 단분자막의 영상을 얻기 위하여 우선 크기 22 X 22 mm, 두께 0.13 mm의 커버 글라스 위에 전자빔 진공 증착기로 약 2 nm 두께의 크롬(Cr)을 증착하고, 연이어 SPR 특성의 최적화를 고려하여 약 45 nm 두께의 금(Au)을 증착하였다. 증착 이전에 Piranha solution ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ :  $\text{H}_2\text{O}_2$ , v/v 4:1)으로 기판을 세척한 다음 곧이어 아세톤과 DI-water로 행구었다. 증착 조건은 진공도 약  $1.6 \times 10^{-6}$  Torr에서 약 0.5 nm/sec의 속도로 증착하였다. 이어서 2 mM의 11-MUA와 11-MUOH 용액에 칩을 담가 상온에서 약 20~24 시간 동안 두어서 단분자막이 형성되도록 하였다. 단분자막이 형성된 칩은 에타놀로 여분의 분자를 세척한 후에 자연 건조시켰다. 칩의 패터닝을 위해서 지름이 300  $\mu\text{m}$  정도의 구멍(Hole)이 규칙적으로 배열되어 있는 금속 Shadow mask를 직접 SAM 코팅 된 센서 칩 위에 두고, 1000 W의 자외선 광원(UV solar simulator, Oriol)을

적어 Thiol 결합을 광 산화(photolyzed)시킨 후 에타놀로 세척하였다. 광 산화를 위한 자외선 광원으로 Hg(Xe) 램프를 금속 마스크가 고정 된 센서 칩에 약 5시간 동안 조사시킨 후에 에타놀로 세정, 건조하였다. 이미징을 위해서 텅스텐-할로젠 램프와 중심 파장이  $\lambda_0=633$  nm인 대역통과 필터, 그리고 TM-mode 편광을 위한 편광기를 부착하였다. 얻어진 평행광을 삼각 프리즘에 입사시켜 내부 전반사에 의해 반사되는 영상을 CCD 카메라로 찍어 PC에 장착된 Frame grabber로 디지털화 된 영상을 획득하였다.

### 3. 결과 및 고찰

표면 플라즈몬 공명에 의한 입사광의 흡수는 입사각이나 광원의 파장에 따른 반사율의 변화로 나타나게 된다. 표면 플라즈몬 이미징의 경우는 고정된 입사각에서 이차원 평면 각 점의 공명 조건의 차이를 표현하는 것이므로, 센서의 구성과 광학적 특성에 따라 명암의 차이가 최대가 되는 입사각 혹은 광원의 파장 조건이 있다. 따라서 이를 위하여 이론적으로 계산이 가능한 반사율을 구하여 그에 따른 최적 조건을 알 필요가 있다.

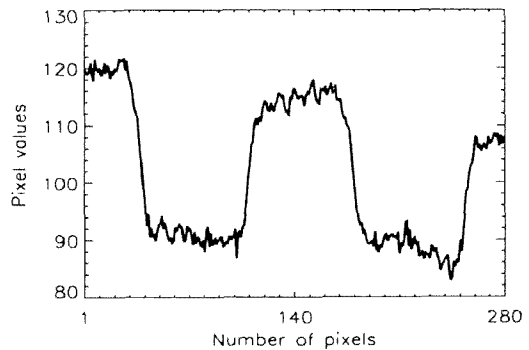
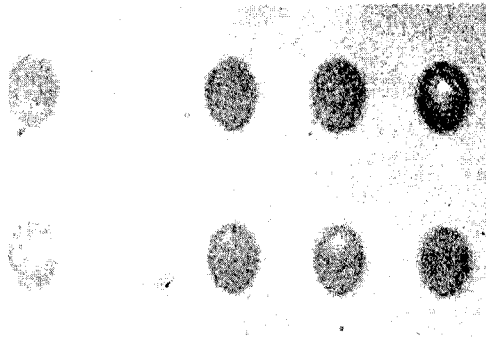


그림 1(A) 금 표면에 코팅된 11-MUA 패턴의 표면 플라즈몬 공명 이미지

그림 1(B): 두 채널 11-MUA의 Surface profile: 세로 방향의 20 pixel을 평균한 값

그림 1의 (A)는 지름이 약  $\phi=300$   $\mu\text{m}$  정도의 구멍이 규칙적으로 배열되어 있는 금속 Shadow mask를 이용하여 금 표면에 11-Mercaptoundecanic acid(11-MUA) 단분자막을 패터닝한 센서 칩의 표면 영상이다. 자외선으로 광산화(Photo-oxidation)처리를 하고 에타놀로 세척한 부분, 즉 금 표면이 드러난 부분이 어둡게, 그리고 나머지 11-MUA가 남

아 있는 부분이 밝게 드러나 있다. (B)는 얻어진 표면 플라즈몬 영상의 각 화소 값을 이용하여 11-MUA의 막 두께를 정량화하기 위한 Line profile이다. 이로부터 이차원 표면에 있어서의 단분자막의 두께를 화소 값에 대해 보정할 수 있고 DNA 및 단백질 칩으로부터 결합하는 염기쌍 혹은 항원 등 Target 물질의 흡착, 분리의 정도를 정량적으로 가늠할 수 있게 한다. 한편, 실험에서 사용된 단분자막, 즉 11-MUA와 11-MUOH의 두께의 차이에 따른 표면 플라즈몬 공명 각도의 변화를 관찰하기 위하여 이미징 실험과는 별도로  $\lambda=633$  nm의 레이저를 이용하여 단분자막이 코팅되어 있을 때와 없을 때, 즉 센서 칩이 BK7/Cr 2nm/Au 45nm/의 구조로만 이루어져 있을 때와 11-MUA 혹은 11-MUOH이 코팅되어 있을 때의 공명각의 변화를 각각 관찰하였다. 이로부터 구한 두께 변화에 대한 공명각의 변화는 11-MUA(MW 218.36)의 경우 약 1.31, 그리고 11-MUOH(MW 204.38)인 경우에는 0.068로 측정되었다. 그러나 타원형광계측법(Ellipsometry)로 알려진 11-MUA 단분자막의 두께는 약 1.6~1.9 nm이고, 파장이  $\lambda=633$  nm(He-Ne)에서의 추정되는 굴절률  $n_{\text{He-Ne}} \sim 1.45$ 를 이용하여 이론적으로 계산된 공명각의 변화는  $\Delta\theta=0.25\sim 0.3$  정도로, 이와 비교해서 본 실험에서 측정된 변화량 1.31는 4배 이상 크다<sup>2</sup>. 이는 hydrocarbon과 mercaptan의 굴절률로부터 추정된 단분자막의 굴절률<sup>3</sup>이 실제보다 작던가 혹은 11-MUA 칩의 세척시 여분의 분자가 충분히 제거되지 않았을 가능성을 말해준다.

#### 4. 요약

본 논문에서는 금속의 표면 플라즈몬 공명으로 인한 금속-유전체 경계면에서의 국소적 전자기장의 강화 효과를 이용하여 표면 플라즈몬을 유발하는 금 박막을 유리 기판위에 증착하고, 프리즘 커플러를 이용한 소산장의 공명 흡수현상을 이차원 영상으로 얻었다. 특히 DNA/단백질 칩 등 향후 가능한 다채널 시스템에의 응용을 고려하여 11-MUA, 11-MUOH 등 자기조립 단분자막(SAM)을 크롬 마스크와 리토그래피, 그리고 Shadow mask와 광 산화반응을 이용하여 금 표면 위에 패터닝 하였다. 텅스텐-할로겐 램프와 중심파장이  $\lambda_0=633$  nm의 대역통과 필터를 사용하여 이 평행광을 프리즘 커플러에 입사시켜 반사되어 나오는 반사광의 이차원 영상을 얻었다. 이와는 별도로  $\lambda_0=633$  nm의 레이저를 이용하여 단분자막이 코팅되어 있을 때와 없을 때의 공명각의 변화를 관찰하였다. 얻어진 이차원 영상의 위치에 따른 화소 값의 변화를 단분자막의 두께의 변화에 따라 보정하고, 알려진 매질의 SPR 특성을 Fresnel 방정식에 따라 이론적으로 계산하면 다채널 표면 영상으로부터 항원-항체 등 단백질의 결합 정도를 정량적으로 측정할 수 있다.

### 참고문헌

1. E. Yeatman and E. Ash, "Surface Plasmon Microscopy"(1987), *Electron. Lett.*, vol. 23(20), pp.1091-1092.
2. C. D. Bain *et. al.*, "Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold"(1999), *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111(1), pp. 321-335.
- 3 실험으로부터 얻어지는 금의 유전율은  $\lambda=633 \text{ nm}$  에서  $\epsilon_1=-8.91+i1.08$ 이고, 11-MUA의 추정되는 유전율은  $\epsilon_2\sim 1.45$ 이다.