

## 폐암 바이오마커 검출용 나노SPR 바이오센서

장은윤<sup>1</sup> · 염세혁<sup>2</sup> · 엄년식<sup>3</sup> · 한정현<sup>3</sup> · 김형경<sup>3</sup> · 신용범<sup>4</sup> · 강신원<sup>5,+</sup>

### Nano SPR Biosensor for Detecting Lung Cancer-Specific Biomarker

Eun-Yoon Jang<sup>1</sup>, Se-Hyuk Yeom<sup>2</sup>, Nyeon-Sik Eum<sup>3</sup>, Jung-Hyun Han<sup>3</sup>, Hyung-Kyung Kim<sup>3</sup>,  
Yong-Beom Shin<sup>4</sup> and Shin-Won Kang<sup>5,+</sup>

#### Abstract

In this research, we developed a biosensor to detect lung cancer-specific biomarker using Anodic Aluminum Oxide (AAO) chip based on interference and nano surface plasmon resonance (nanoSPR). The nano-porous AAO chip was fabricated 2  $\mu\text{m}$  of pore-depth by two-step anodizing method for surface uniformity. NanoSPR has sensitivity to the refractive index (RI) of the surrounding medium and also provides simple and label-free detection when specific antibodies are immobilized to the Au-deposited surface of nano-porous AAO chip. To detect the lung cancer-specific biomarker, antibodies were immobilized on the surface of the chip by Self Assembled Monolayer (SAM) method. Since then lung cancer-specific biomarker was applied atop the antibodies immobilized layer. The specific reaction of the antigen-antibody contributed to the change in the refractive index that cause shift of resonance spectrum in the interference pattern. The Limit of Detection (LOD) was 1 fg/ml by using our nano-porous AAO biosensor chip.

**Keywords :** Biosensor, Lung cancer-specific biomarker, AAO, Nano SPR, Interference

#### 1. 서론

폐암은 전세계 발병률 2위이며 사망률 1위인 암으로서 예후가 극히 불량하여 5년 내 생존율이 약10% 정도로 매우 낮다[1, 2]. 폐암

의 진단은 일반적으로 흉부엑스선검사, 흉부컴퓨터단층촬영, 객담 세포진검사, 기관지내시경검사 등의 방법이 있으나 이러한 진단방법들은 병증이 어느 정도 진행된 후의 진단에서는 육안관찰이 용이하나 초기에는 뚜렷한 증상이 없어 조기진단은 매우 어렵다[3, 4].

이에 따라 폐암의 조기 진단을 위하여 폐암의 발병에 따라 체내에서 특이적으로 발현되는 바이오마커의 검색 및 이를 이용한 항체의 개발이 전세계적으로 진행 중에 있다. 이 중 혈청 아밀로이드 A(serum amyloid A, SAA)는 반응성 아밀로이드증(reactive amyloidosis)의 염증상황의 전구물질로서 다양한 신체 내 염증 상황에서 혈청 내 농도가 증가하는 주된 급성기 단백질(acute phase protein)로 알려져 있다. SAA 다중유전자 패밀리(SAA multigene family)는 네 개의 유사한 유전자를 포함하는데 이들 중 SAA1과 SAA2가 급성기 반응(acute phase response)에 나타나는 주된 단백질로서 특히 폐암환자에게서 특이적으로 과 발현된다고 보고되고 있다[5]. 이는 SAA1 또는 SAA2가 폐암의 조기진단을 위한 검사지표로서의 활용이 가능함을 시사하며 이를 이용한 진단시스템의 개발 또한 가능하게 한다. 이를 위하여 SAA1 또는 SAA2와 특이적으로 반응하는 항체의 개발 및 이를 통한 사업화가 이루어지고 있다 [6, 7].

나노 표면 플라즈몬 공명(nano surface plasmon resonance, nanoSPR)현상을 이용한 센서 시스템은 빠른 응답 속도와 높은 감도를 가지고 있어 매우 낮은 농도의 생체 물질을 검출할 수 있는 장

<sup>1</sup>경북대학교 센서 및 디스플레이공학과(Department of Sensor and Display Engineering, Kyungpook National University)  
IT 3-202, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk-dong, Bukgu, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>경북대학교 기능성소자융합플랫폼센터(Center for Functional Devices Fusion Platform, Kyungpook National University)  
College of Engineering Bldg. 7-321, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk-dong, Bukgu, Daegu 702-701, Korea

<sup>3</sup>쥬유바이오메드(U-BioMed Inc.)  
U-BioMed Inc., #303, B.I. Center, Kyungpook National University, 80 Daehak-ro, Buk-gu, Daegu 702-701, Korea

<sup>4</sup>한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology)  
125 Gwahangno, Yuseong-hu, Daejeon, 305-806, Korea

<sup>5</sup>경북대학교 IT대학 전자공학부(School of Electronics Engineering, College of IT Engineering, Kyungpook National University)  
IT 3-202, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk-dong, Bukgu, Daegu 702-701, Korea

<sup>+</sup>Corresponding author: swkang@knu.ac.kr

(Received : Feb. 1, 2013, Accepted : Mar. 21, 2013)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

점을 가지고 있다. nanoSPR은 금속에 빛이 입사될 경우 금속 내의 자유 전자가 집단적으로 진동하는 현상에 따라 금속 표면에서 국소적으로 매우 증가된 전기장이 발생하는 현상으로서 금속 표면에 나노 구조 형성에 따른 유도가 가능하다[8]. 따라서 본 연구에서는 다공성 양극산화 알루미늄(anodic aluminum oxide, AAO)을 기반으로 한 바이오센서 칩을 이용하여 nanoSPR 현상을 이용한 광학식 바이오센서의 개발을 위해 AAO의 광 간섭현상을 나타낼 수 있도록 광학적 특성이 가장 뚜렷이 나타나는 기공의 직경과 두께로 칩을 제작하고 니켈과 금을 증착하여 nanoSPR 현상을 유도하고자 하였다[9, 10]. nanoSPR 센서 시스템은 AAO 칩 상에서 검출농도 변화에 따른 반사광 파장의 이동을 측정할 수 있도록 제작하였다. 제작된 센서 칩과 시스템은 폐암환자에게서 발견되는 SAA1의 최저 검출농도를 확인하기 위하여 농도 별로 응답 특성을 평가하였고 이에 따른 폐암의 진단 가능성을 고찰하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1 바이오센서 측정 시스템의 구성 및 분석

센서 시스템의 구성은 Fig. 1에 나타냈으며 바이오센서 칩의 광학적 특성을 평가하기 위해 (주)유바이오메드에서 제작한 분광기와 백색광원이 통합된 센서시스템 및 Y형 광섬유 다발, 테플론 챔버 및 홀더로 구성되었으며 바이오센서 칩은 홀더에 고정되어 챔버에 삽입시킬 수 있도록 하였다.

광원은 텅스텐-할로젠(tungsten-halogen)램프로 구성되어 있으며, 파장 영역은 360-2000 nm이다. 분광기는 200-1100 nm의 넓은 감지 영역을 가지고 optical resolution 은 0.14-7.7 nm FWHM (Full Width at Half Maximum)이며 투과, 흡수, 반사 등 다양한 측정 기능이 있다. 검출된 빛은 분광기와 연결된 컴퓨터의 분광 분석 프로그램(Spectrasuit, Ocean Optic INC., USA)에 의해 분석하였다[11].

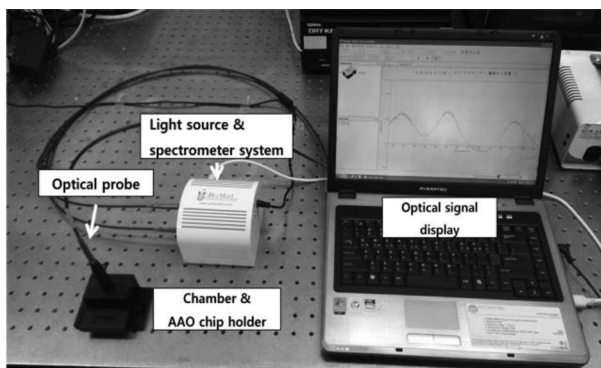


Fig. 1 Photograph of equipment of measurement system.

### 2.2 다공성 양극 산화 알루미늄 칩 제작

다공성 양극 산화알루미늄은 오래 전부터 금속 표면처리 기술 중 하나로 알려져 있으며 본 연구에서는 Masuda 연구팀에서 개발한 2차 양극산화방법(two-step anodization)으로 제작하였다. 이 방법은 1차 양극 산화방법에 비하여 다공의 정렬도가 높으며 기공의 크기 또한 제어가 용이하다[12-14].

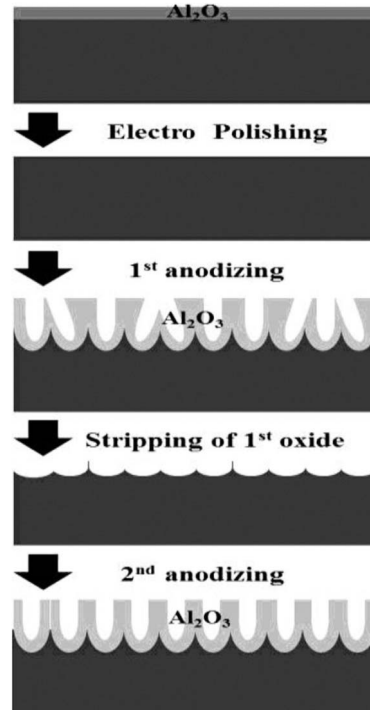


Fig. 2. Experimental procedures of the two-step anodizing process for nano-porous AAO chip fabrication.

2차 양극산화방법은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 4단계의 과정으로 이루어진다. 처음으로 자연산화된 알루미늄 표면을 전해연마하여 순수한 알루미늄 표면을 만들고 1차 양극산화 과정을 거쳐 다공성 양극산화 알루미늄을 제작한다.

이후 다공성 양극산화 알루미늄층은 약품처리 과정을 거쳐 표면을 식각한다. 식각된 알루미늄은 2차 양극산화 과정을 통하여 정렬도가 높은 다공성 양극산화 알루미늄이 된다.

구체적인 실험방법으로 알루미늄 포일(aluminum foil, 99.999% Al, AL000650/714, Goodfellow Cambridge Ltd., England)은 일정한 크기로 절단하여 사용하였으며 전해질 용액은 0.3 M의 옥살산(oxalic acid, SIGMA-ALDRICH, USA)을 사용하였고 양극산화 시 흑연판을 전해질 내 음극판으로 사용하였다.

양극산화 전 알루미늄 포일 표면에 생성되어 있는 자연 산화막의 제거 및 알루미늄 표면의 평탄화를 위하여 30% 에탄올(ethanol, DUKSAN, Korea)과 70% 과염소산(perchloric acid, JUNSEI,

Japan)을 혼합한 용액에 알루미늄 포일을 넣고 20 V의 전압을 인가하여 전해 연마(electro polishing)를 진행하였다.

전해 연마를 마친 알루미늄 포일은 전해질 용액에 넣고 양극 (+)을 인가시키고 상대 전극인 흑연판에는 음극 (-)을 인가하여 40 V의 전압으로 양극산화를 진행하였다. 1차 양극산화로 생성된 양극산화막은 1.8 wt% 크롬산(chromic acid, SIGMA, USA)과 6 wt% 인산(phosphoric acid, DUKSAN, Korea) 혼합용액에 넣고 60°C에서 90 분 동안 식각처리 하였다.

2차 양극산화 방법은 1차 양극산화 방법과 동일한 방법을 사용하여 33분 동안 산화시켜 다공성 AAO 칩을 제작하였다.

### 2.3 AAO 칩 금 증착 및 측정감도 분석

바이오물질의 고정화 및 nanoSPR 현상의 유도를 위하여 AAO 칩 표면에 금을 증착하였다.

다공성 AAO에 전자선 증착기(electron-beam evaporator, SRN-110-1505-R2, SORONA INC., Korea)를 사용하여 니켈 50 Å, 금 150 Å의 두께로 니켈, 금의 순서로 증착하였다. 평균 증착 속도는 초당 0.1 Å 정도이며, 증착기의 진공도는  $4.0 \times 10^{-6}$  torr 이다. 니켈은 접합 층으로써 다공성 AAO에 금을 정렬도가 높게 증착하기 위하여 사용되었으며 금만 증착된 순수 단일막 보다 니켈을 증착하고 금을 증착했을 때 더 좋은 nanoSPR 현상을 나타내는 것으로 보고되고 있다[15].

이 후 금이 증착된 다공성 AAO와 금을 증착하지 않은 다공성 AAO는 측정 시스템을 이용하여 표면 반사율을 비교하였다. 아무것도 처리하지 않은 알루미늄을 반사광의 reference로 한 다음 두 샘플의 반사율을 측정하였다.

또한 금이 증착된 센서 칩의 표면 굴절률 변화에 대한 광학 특성을 확인하기 위해 글리세린(glycerin) 용액을 증류수에 6, 9, 12, 15 wt% 농도의 질량비로 희석해 굴절률 용액을 제조하였다. 농도가 다른 글리세린 굴절률 용액을 금이 증착된 AAO 표면에 도포한 뒤 측정 시스템을 이용하여 굴절률 변화에 대한 반사광의 변화를 비교하였다.

### 2.4 항체 고정화 및 SAA1-SAA1항체 반응실험

금이 증착된 다공성 AAO에는 금 표면과 강한 친화도를 가지는 alkanethiol 자기조립 단분자막(self-assembled monolayers, SAMs)을 형성시켰다. 자기조립 단분자막은 금 표면의 티올 분자(-SH)의 자발적인 화학 흡착에 의해 이루어지고 간단한 실험 방법을 통해 짧은 시간 내에 제조가 가능하고 완벽한 재현성을 가진다. 또한 단결정에 가까운 이차원 격자구조를 이루는 장점이 있다[16]. 자기조립 단분자막은 주어진 기질의 표면에서 자발적이고 규칙적으로 정렬된 유기 분자막을 말한다. 자기조립 단분자막은 반응기, 긴 알칸사슬, 작용기로 이루어져 있는데 본 연구에서는 카르복실기를 가

지는 11-Mercapto-undecanoic acid(11-MUA, ALDRICH, USA)를 에탄올(ethanol, DUKSAN, Korea)에 20 mM로 제조한 다음 AAO 칩을 20 mM 11-MUA 용액 내에 dipping하여 실온에서 24 시간 동안 웨이킹(shaking)하였다. 이 후 순수 에탄올을 이용하여 AAO 칩을 3회 세척하고 질소 가스로 건조시켜 표면 개질을 완료하였다[17]. 그 다음 표면이 개질된 AAO 칩 위에 SAA1에 특이적으로 반응하는 항체의 결합을 위해 항체에 존재하는 아민기(-NH<sub>2</sub>)와 카르복실기(-COOH)의 coupling agent인 N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, SIGMA, USA)와 N-hydroxysuccinimide (NHS, SIGMA, USA)를 증류수와 dimethyl sulfoxide (DMSO, DUKSAN, Korea)에 각각 200, 50 mM로 제조한 다음 두 용액을 동일한 비율로 혼합한 다음 표면이 개질된 AAO 칩을 혼합용액에 dipping하여 1 시간 동안 상온에서 웨이킹하고 증류수로 세척하여 질소 가스로 건조하였다. SAA1에 특이적으로 반응하는 항체(100 µg/ml, (주)프로탄바이오, Korea) 40 µl를 EDC/NHS 반응시킨 AAO 칩 위에 dropping 후 1시간 동안 반응시켜 감지막을 완성하였으며 모식도는 Fig. 3과 같다.

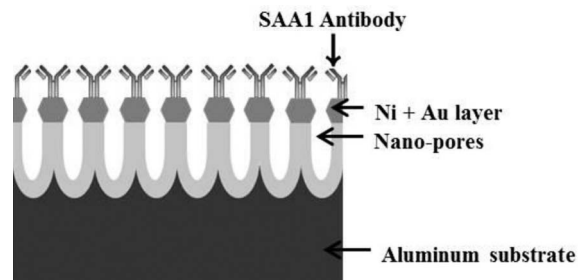


Fig. 3. Schematic diagram of sensing membrane.

감지막이 형성된 다공성 AAO에 폐암 환자에게서 과 발현되는 SAA1(주)프로탄바이오, Korea)을 1 fg/ml, 100 fg/ml, 10 pg/ml, 1 ng/ml, 100 ng/ml의 농도로 준비하였다. SAA1 항체가 고정된 칩 상에 SAA1을 저농도에서 고농도의 순서로 각각 40 µl dropping 후 30분간 반응시킨 뒤 0.05 M Tris-HCl buffer (WELGENE, Korea)로 세척하고 감지막의 반사광을 측정하여 파장의 변화를 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 바이오센서 칩의 특성 평가

바이오센서 칩으로 사용된 다공성 AAO의 균일도 분석은 전계 방사형 주사전자현미경(FE-SEM, S-4800, Hitach Co. Ltd., Japan)을 통하여 다공성 표면 및 측면을 관찰하였다. 1차 양극산화

후 AAO는 불균일한 다공성 표면을 나타내었으나 2차 양극산화를 마친 AAO는 약 35 nm 크기의 기공이 고르게 분포되어 있으며 측면에는 약 2 μm 두께의 산화알루미늄 층과 함께 기공에 의한 수직패턴이 균일하게 배열되어 있음을 확인하였다(Fig. 4).

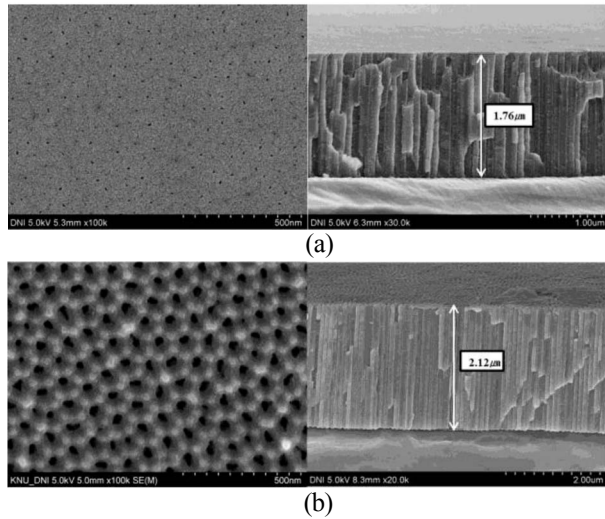


Fig. 4. FE-SEM images of surface and cross-sectional view of AAO chip; (a) after 1<sup>st</sup> anodization and (b) after 2<sup>nd</sup> anodization.

금이 증착된 다공성 AAO의 표면코팅확인은 에너지분산엑스선 스펙트럼분석기(energy dispersive X-ray spectrometer, S-4300 & EDX-350, Hitach Co. Ltd., Japan)를 이용하여 금과 니켈이 존재함을 확인하였으며 Table 1.에 나타내었다.

Table 1. Elementary analysis of Ni and Au-deposited AAO chip

Element	Weight (%)	Atomic (%)
O	32.18	61.06
Al	25.45	28.63
Ni	10.39	5.37
Au	31.99	4.93
Totals	100.00	

구성된 측정 시스템을 이용하여 표면 처리되지 않은 알루미늄을 reference로 하여 다공성 AAO와 금이 증착된 다공성 AAO 표면에서 반사율의 fringe변화를 비교 분석한 결과, 금이 증착되지 않은 다공성 AAO에 비하여 금이 증착된 다공성 AAO는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 뚜렷한 fringe 패턴을 관찰할 수 있었다.

글리세린 용액을 이용한 다공성 AAO칩의 굴절률 변화는 글리세린 용액의 굴절률 변화에 따른 반사광 파장 이동에 대한 응답특성을 굴절지수(refractive index unit, RIU)로 나타내었다. 농도 별로

제조된 용액은 아베 굴절계(abe refractometer, Prisma, CETI, England)를 통하여 굴절률을 측정하였고 그 값을 Table 2에 나타내었다. 굴절률 변화에 대한 감도는 약 695 nm/RIU의 감도특성을 나타내었다(Fig. 6).

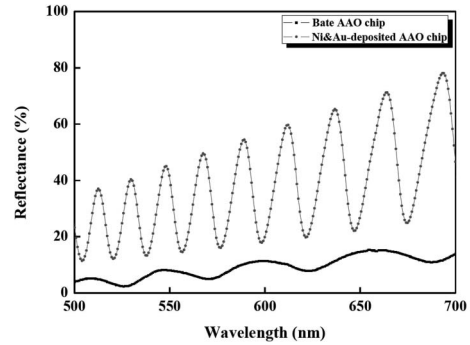


Fig. 5. Reflection properties of fabricated nano-porous AAO chip.

Table 2. The Refractive index of glycerin solution

Glycerin(wt%)	Refractive index
6	1.3392
9	1.3430
12	1.3458
15	1.3491

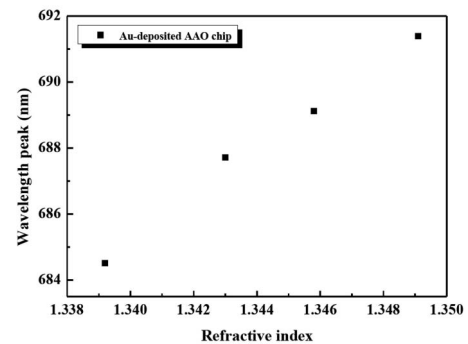


Fig. 6. Shift in the reflectance wavelength  $\lambda_{max}$  with variations in refractive index.

### 3.2 농도 별 SAA1의 응답 특성 확인

SAA1은 앞서 언급한 것과 같이 폐암환자에게서 과 발현되는 단백질로서 항체가 고정된 다공성 AAO 칩을 이용하여 검출하였다. 항체가 고정된 다공성 AAO칩에 SAA1을 1 fg/ml, 100 fg/ml, 10 pg/ml, 1 ng/ml, 100 ng/ml 의 농도로 준비한 뒤 저농도에서 고농도의 순서로 반사광 파장 이동 변화를 측정하였다. Fig. 7은 다양한 농도의 SAA1을 측정하 이후, 감지막에서 반사광 파장의 이동을 나



타낸 것이다 SAA1의 농도가 증가할수록 측정된 감지막의 반사광 파장이 적색편이(red shift)하였고 제작된 센서의 측정한계는 1 fg/ml 임을 확인하였다.

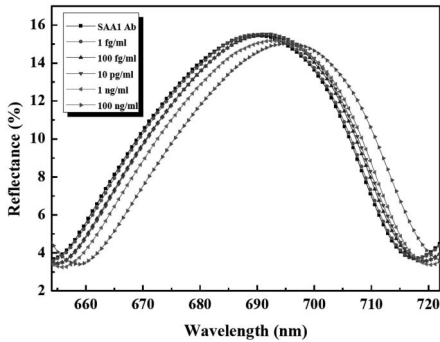


Fig. 7. Shift in the reflectance wavelength with variations in SAA1 concentration.

반복실험을 통하여 제작된 바이오센서 칩의 신뢰성을 확인하였으며 Fig. 8에 표준편차로 나타내었다. 또한 회귀분석을 통하여 SAA1에 대한 응답특성을 확인 결과 결정계수가 0.97897로 강한 양적 선형관계를 가지므로 제작된 바이오센서 칩은 높은 정확도를 가지는 것을 알 수 있었다[18].

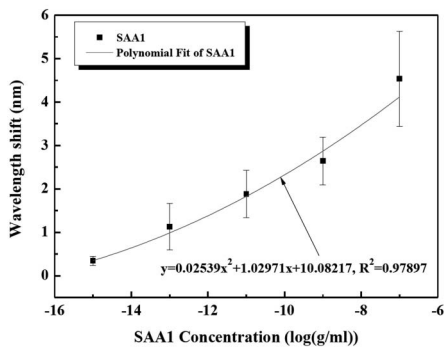


Fig. 8. Shift in the reflectance wavelength  $\lambda_{max}$  and regression analysis according to variations in SAA1 concentration.

#### 4. 결론

본 연구에서는 nanoSPR 현상과 광 간섭현상 원리를 이용하여 금이 증착된 다공성 AAO를 센서 칩으로 사용한 결과 폐암의 특이적 바이오마커인 SAA1을 낮은 농도 범위까지 검출할 수 있었다.

2  $\mu$ m 두께의 다공성 AAO를 제작하였고 금 증착을 통하여 nanoSPR 현상을 유도하였다. 이 때 굴절률 변화에 대한 반사광 파장 이동을 확인 결과 약 695 nm/RIU의 감도를 나타내었다.

SAA1에 대한 응답 특성 확인 결과, SAA1의 농도가 증가할수록

감지막의 반사광 파장이 적색편이 하는 특성을 확인할 수 있었으며, 제작된 바이오센서는 측정 한계가 1 fg/ml로써 높은 감도를 나타냄을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 개발된 바이오센서는 혈액 내에서 존재하는 폐암의 특이적 바이오마커를 낮은 농도 범위까지 측정할 수 있어 폐암의 조기 진단을 위한 바이오센서로서 활용이 가능할 것이다.

#### 감사의 글

본 연구는 중소기업 융복합기술개발사업(SD122841)의 지원으로 수행되었으며, 또한 이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(NO. 2008-0062437).

#### REFERENCES

- [1] Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Robbins Basic Pathology, 7th Ed.*, Saunders, Philadelphia, 2003.
- [2] Boring, C. C., Squires, T. S., and Tong. T., "Cancer statistics, 1993", *CA Cancer J. Clin.*, Vol. 43, pp. 7-26, 1993.
- [3] Berlin, N. I., Buncher. C. R., Fontana. R. S., Frost, J. K., and Melamed, M. R., "The national cancer institute cooperative early lung cancer detection program", *Am. Rev. Respir. Dis.*, Vol. 130, pp. 545-549, 1984.
- [4] Tockman, M. S., "Survival and mortality from lung cancer in a screened population", *Chest*, Vol. 89, pp. 324S-325S, 1986.
- [5] WCS Cho, TT Yip, WW Cheng and JSK Au, "Serum amyloid A is elevated in the serum of lung cancer patients with poor prognosis", *British Journal of Cancer*, Vol. 102, No. 12, pp. 1731-1735, 2010.
- [6] Emiliano Cocco, Stefania Bellone, Karim El-Sahwi, Marilisa Cargnelutti, Natalia Buza, Fattaneh A. Tavassoli, Peter E. Schwartz, Thomas J. Rutherford, Sergio Pecorelli, and Alessandro D. Santin, "Serum amyloid A : A novel biomarker for endometrial cancer", *Cancer*, Vol. 116, Iss. 4, pp. 843-851, 2010.
- [7] Howard BA, Wang MZ, Campa MJ, Corro C, Fitzgerald MC, and Patz EF Jr., "Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis",

- Proteomics*, Vol. 3, pp. 1720-1724, 2003.
- [8] Hutter, E and J. H. Fendler, "Exploitation of localized surface plasmon resonance", *Adv. Mater.*, Vol. 16, pp. 1685-1706, 2004.
- [9] L. C. Archibald, J. S. Leach, "The anodic oxidation of zirconium I. growth stresses in anodic ZrO<sub>2</sub> films", *Electrochimica Acta.*, Vol. 22, pp. 15-20, 1977.
- [10] J. H. Kim, "The design and fabrication of the accelerat ion sensor using the cantilever and the Fabry-Perot interferometer", *M. S. Dissertation, Kyungpook Nat'l Univ.*, Korea, 2002.
- [11] S. H. Yeom, H. Yuan, W. Y. Choi, N. S. Eum, S. W. Kang, "Development of LSPR based biosensor using Au deposited nano-porous AAO chip", *Sens. Lett.*, Vol. 9, No. 1, pp. 92-96, 2011.
- [12] J. D. Edward and F. Keller, "The structure of Anodic oxide coatings", *Trans. Am. Inst. Min. Metall. Eng.*, Vol. 156, p. 288, 1944.
- [13] H. Masuda and K. Fukuda, "Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina", *Science*, Vol. 268, Iss. 5216, pp. 1466-1468, 1955.
- [14] S. H. Yeom, O. G. Kim, B. H. Kang, K. J. Kim, H. Yuan, D. H. Kwon, H. R. Kim, and S. W. Kang, "Highly sensitive nano-porous lattice biosensor based on localized surface plasmon resonance and interference", *Optics Express*, Vol. 19, Issue 23, pp. 22882-22891, 2011.
- [15] H. Liu, B. Wang, E. S. P. Leong, P. Yang, Y. Zong, G. Si, J. Teng, and S. A. Maier, "Enhanced surface plasmon resonance on a smooth silver film with a seed growth layer", *ACS Nano*, Vol. 4, No. 6, pp. 3139-3146, 2010.
- [16] Ahmed Busnaina, *Nanomanufacturing Handbook*, CRC Press, USA, pp. 33-50, 2006.
- [17] Y. S. Chi, S. M. Kang, and I. S. Choi, "Surface engineering based on self-assembled monolayers", *Polymer Science and Technology*, Vol. 17, No. 2, pp. 172-181, 2006.
- [18] D. S. Kim, *Regression Analysis*, Bobmunsa, Korea, pp. 18-31, 1994.