《연구논문》 Korean Journal of Optics and Photonics, Volume 24, Number 2, April 2013
DOI: http://dx.doi.org/10.3807/KJOP.2013.24.2.086

근접장-분자반응 간의 중첩을 이용한 표면 플라스몬 공명 센서 감도 평가에 관한 연구

류연수 · 손태황 · 김동현†

연세대학교 전기전자공학부, 의료기기기술 연구소
㊞ 120-749 서울시 서대문구 연세로 50번지

(2013년 3월 18일 받음, 2013년 3월 28일 수정본 받음, 2013년 4월 5일 게재 확정)

본 논문에서는 근접장-분자반응 간의 중첩을 이용한 표면 플라스몬 공명 (SPR) 바이오센서의 측정감도 평가방법을 연구하였다. 전달행렬 방법을 사용하여 다양한 형태의 중첩적분으로 정의된 광학자취 값을 계산하였고, 샌드위치 및 역샌드위치 면역글로뷸린 (IgG) 어세이에 대해서 실험적으로 측정된 수치와 비교하였다. 이론 및 실험적인 결과와의 비교를 통하여 접선 방향의 전기장을 사용한 광학자취의 경우 그 연속성으로 말미암아 가장 높은 상관계수를 얻을 수 있었으며 이때 광학자취와 측정감도 사이에 97% 이상의 높은 상관계수가 존재함을 보았다. 이러한 상관관계는 SPR 바이오센서의 측정 감도에 관한 메커니즘을 분명하게 설명하며, 분자 스케일 감도를 가지는 SPR 바이오센서 개발에 기여하게 될 것이다.

Near-field Evaluation of Surface Plasmon Resonance Biosensor Sensitivity Based on the Overlap Between Field and Target Distribution

Yeonsoo Ryu, Taehwang Son, and Donghyun Kim†

School of Electrical and Electronic Engineering, Yonsei Institute of Medical Instruments Technology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

(Received March 18, 2013; Revised manuscript March 28, 2013; Accepted April 5, 2013)

In this study, we have investigated the correlation of far-field detection sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) biosensors with optical signatures associated with the near-field overlap of biomolecules. The results confirm a direct relation between the far-field and near-field parameters, particularly for optical signatures defined in terms of lateral electric field components that are tangential to the interface and thus continuous across the interface. The overall correlation between near-field optical signatures and far-field resonance shift exceeded 97%. The results can be highly useful to evaluate detection sensitivity of SPR biosensors that take advantage of complex structures for localization of surface waves.

Keywords: Surface plasmon resonance, Optical biosensor, Detection sensitivity, Near-field distribution, Sandwich immunoglobulin G (IgG) assays
OCIS codes: (240.6680) Surface plasmons; (250.5403) Plasmonics; (280.1415) Biological sensing and sensors

I. 서 론

표면 플라스몬(surface plasmon: SP)은 금속이 유전체와 계면을 형성하고 있을 때, 금속의 표면에 있는 전자가 형성하는 밀도 파를 가리킨다. 표면 플라스몬 파는 금속 표면에서 최대 세기를 가지다가 계면에서 수직으로 멀어질수록 지수함수적으로 감소하는 특징을 가지고 있으며 이러한 현상을 나타내는 금속은 금, 은, 구리, 알루미늄 등과 같이 외부 자극에 의해 전자 방출이 쉽고 음의 유전상수를 갖는 금속들이 주로 사용된다. 광원의 모멘텀-매칭(momentum matching)에 의하여 표면 플라스몬이 생성되는 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance: SPR) 현상은 금속표면의 굴절률 변화에 민감하게 변화하는 특성을 가지고 있으므로, 이러한 특성을 이용한 표면 플라스몬 공명 센서가 분자간 상호작용에 관한 정량적 분석 등 여러 분야에서 사용되고 있다.

표면 플라스몬 공명 센서는 비표지 분석 방법으로 단백질 상호작용 분석을 실시간으로 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나, 이러한 장점의 직접적인 결과, 표지물질을 사용하는 분석 방법에 비하여 측정감도(detection sensitivity)가 떨어지는 단점이 있다. 따라서, 표면 플라스몬 센서의 감도를 향상

†E-mail: kimd@yonsei.ac.kr
Color versions of one or more of the figures in this paper are available online.

시키기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 예를 들면, 광학적으로 조밀한 나노 입자를 결합 분자들 사이에 링커로 사용하거나[1-3], SPR에 상호보완적인 효과를 이용하는 연구도 시도되고 있다.[4, 5] 분자작용을 동반하는 위상의 변화를 감지하는 방식과,[6-8] 금속 표면에 제작된 나노 구조를 사용한 플라스몬 국소화 방식도 연구되고 있다.[9-13] 최근 많이 시도되고 있는 방법은 국소화된 표면파에 형광 물질을 사용한 단분자 측정을 시도하거나,[14-16] 금속 박막에 나노 구조를 제작하여 표면파에 국소화를 유도하고 이에 생체분자를 동시 국소화(co-localization)시키는 방법으로,[17-22] 금 나노 입자와 결합함으로써 300배 이상 감도를 향상시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다.[23]

그러나 이러한 시도에도 불구하고 아직도 가장 기본적인 감도와 생체분자 분포 간의 상관 관계에 대해서 분명하게 규명되지 못하고 있으며 따라서 표면 플라스몬 공명 센서를 사용하여 얻을 수 있는 궁극적인 측정한계 (limit of detection: LOD)에 대하여 분명하게 말할 수 없는 것이 사실이다. 이를 위하여 측정 대상인 생체분자의 분포 또는 생체분자가 갖는 광학자취(optical signature)와 표면 플라스몬 공명 센서의 감도간의 상관관계를 이해하기 위한 몇몇 연구가 시도되었다. 예를 들면, 생체분자 분포와 표면파간의 중복(overlap)된 자취를 계량하기 위한 중복적분이 제안되었으며,[24] 이차원 나노 격자에 대하여 계량적으로 실증된 바 있다.[25, 26] 최근에는 박막 표면에서 일어나는 면역 반응을 통하여 상관관계를 규명하기도 하였다.[27] 근접장-타겟 중첩에 기반한 감도측정을 평가하는 방법은 다른 유형의 바이오센싱, 예를 들면 속삭이는 회랑(whispering gallery) 모드 바이오센서에서 사용되었다.[28]

본 연구에서 우리는 근접장-생체분자의 중첩에 근거한 광학자취와 SPR 센서 측정감도 사이의 상호관계를 조사하고자 하였다. 전술한 바와 같이 다양한 근접장 모델에 기반한 광학자취와 측정 감도의 상관관계에 대해서는 이론적으로 충분히 분석된 반면[26] 실험적으로는 단순한 광학자취 모델에 대해서만 연구되었으므로, 본 연구에서는 여러 가지 근접장 모델을 바탕으로 한 근접장 기반 광학자취를 구성하여 실험치와 비교하였다. 실험 결과로는 박막기반 SPR 구조를 사용하여 휴먼면역글로뷸린 G (h-IgG)와 이에 상보적으로 반응하는 앤티-휴먼면역글로뷸린 G (a-h-IgG)가 샌드위치 구조로 상호작용하는 반응의 측정 결과를 사용하였다. 이를 통하여 다양한 광학자취 모델과 실험결과의 상관 분석을 통하여 가장 유효한 분석모델을 도출하고, 계량적으로 보고된 연구결과를 확증하고자 하였다. 본 연구 결과는 근접장-분자반응 간의 중첩과 표면 플라스몬 공명 센서의 측정감도간의 상관관계를 이해함으로써 궁극적으로는 분자스케일의 감도를 가지는 표면 플라스몬 공명 센서의 개발에 기여할 것으로 기대된다.

II. 수치해석 모델 및 실험방법

2.1. 수치해석 모델

그림 1은 수치해석에 사용된 모델로서, SF10 유리기판에 증착된 50-nm 두께의 금 박막 표면 위에 항원, 항체, 항원이 순차적으로 적층되어 항체가 샌드위치된 구조로 모델링하였다. 샌드위치 어세이에서 사용된 h-IgG와 a-h-IgG의 적층 순서에 따라 그림 1(a)의 모델에서는 a-h-IgG/h-IgG/a-h-IgG 층이 금속 박막 상에 적층된 샌드위치 어세이로, 그림 1(b)에서는 h-IgG/a-h-IgG/h-IgG 순서로 적층된 역샌드위치 어세이를 가정하였다. 박막구조 상의 이론적 계산은 분석적(analytical) 방법을 사용하는 것도 가능하지만 보다 용이한 계산을 위하여 수치해석을 수행하였으며, 수치해석을 위하여 아벨레스 전달행렬(Abeles Transfer Matrix) 방법을 사용하여 생체분자가 존재하는 박막 표면의 전기장을 계산하였다. 모델에 필요한 SF10, 금, 크롬, SiO_2의 광학 상수들은 참고문헌을 참조하였다.[29] 모델에 사용된 모든 층은 균일(homogeneous)하고 광학적으로 등방(isotropic)인 것으로 가정하였다. h-IgG와 a-h-IgG의 굴절율은 1.41~1.49 범위에 있는 것으로 보고된 바 있다.[30, 31] 본 논문에서는 h-IgG 항체와 항원의 굴절율은 1.41로 가정하였다. h-IgG와 a-h-IgG의 굴절율은 이중층 구조에서 유효 광학상수를 고려하지 않고 동일하다고 가정하였다. 따라서, 본 수치분석 모델에서는 h-IgG와 a-h-IgG의 상호작용을 광학적으로 상이한 물질이 적층되는 것이 아니라, 반응의 결과 광학적으로 동일한 분자층의 두께가 커지는 것으로 모델하고 있다고 볼 수 있으며 그 결과 금속 박막과 IgG의 이중층 모델에 의해서 SPR 센서의 광학적 특성을 설명할 수 있다.[32] h-IgG와 a-h-IgG층의 두께는 각각 7 nm와 9 nm로 가정하였다.[33] 버퍼의 유효 굴절율은 물의 굴절률과 동일하게 1.33으로 가정하였다. 또한, 광원은 λ=632.8 nm 파장의 p-편광된 단일파장 광원으로 모델하였다.

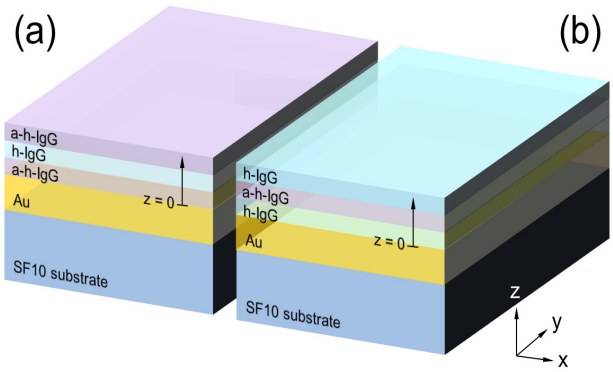

FIG. 1. Schematic of the SPR biosensing chip geometries considered for numerical calculation: (a) sandwiched antibody assay of a-h-IgG, h-IgG, and a-h-IgG interactions and (b) reverse sandwiched assay of h-IgG, a-h-IgG, and h-IgG interactions on metallic thin film.

2.2. 이동매트릭스 분석

그림 1의 모델에서 크롬 접합층을 무시하고, SF10 기판, 금 박막, IgG, 버퍼 내의 전기장(자기장)을 각각 $E_0(H_0)$, $E_1(H_1)$, $E_2(H_2)$, $E_3(H_3)$ 라고 할 때, 실제 광학자취에 기여하는 전기장(자기장)은 $E_2(H_2)$와 $E_3(H_3)$ 이다. 이와 같은 전자기장은 아벨레스 전달 행렬에 의해서 계산할 수 있고, 전기장의 경우 다음 식(1)과 식(2)와 같이 주어진다.[34]

$$E_2 = \frac{2t_{01}t_{12}t_{23}E_0\cos[k_2d_2\cos\theta_3 - n_3k_{in}(x\sin\theta_3 + z\cos\theta_3)]}{(e^{j\phi_1} + r_{01}r_{12}e^{-j\phi_1})e^{j\phi_2} + (r_{12}e^{j\phi_1} + r_{01}e^{-j\phi_1})r_{23}e^{-j\phi_2}} \quad (1)$$

$$E_3 = \frac{t_{01}t_{12}t_{23}E_0\exp[-jn_3k_{in}(x\sin\theta_3 + z\cos\theta_3)]}{(e^{j\phi_1} + r_{01}r_{12}e^{-j\phi_1})e^{j\phi_2} + (r_{12}e^{j\phi_1} + r_{01}e^{-j\phi_1})r_{23}e^{-j\phi_2}} \quad (2)$$

여기서, k_i와 $\theta_i(i=0, 1, 2, 3)$는 각각의 영역 내에서의 파수(wave number)와 표면의 수직선에 대한 광진행각도를 나타낸다. ϕ_i는 각 영역에서의 광경로길이로서 $\phi_i=k_id_i\cos\theta_i(i=0, 1)$이다. k_{in}는 진공에서의 파수이다. 예를 들어, $k_2=kn_2$는 IgG 층 내에서의 파수이고 d_1과 d_2는 각각 금 박막과 IgG 층의 두께이다. 자기장 $H=k\times E/\mu$(μ: 투자율)로 주어지므로, IgG와 버퍼에서의 자기장은 식 (1)과 (2)로부터 계산할 수 있으며, 광파워의 흐름을 나타내는 포인팅벡터 $S=E\times H$로 주어진다. 한편, 금 박막-IgG층과 IgG층-버퍼층 경계에서 p-편광된 빛의 반사계수(r_{12}, r_{23})와 투과계수(t_{12}, t_{23})는 식(3)-(6)과 같이 구해진다.

$$r_{12} = \frac{n_2/\cos\theta_2 - \sqrt{\varepsilon_1}/\cos\theta_1}{n_2/\cos\theta_2 + \sqrt{\varepsilon_1}/\cos\theta_1} \quad (3)$$

$$r_{23} = \frac{n_3/\cos\theta_3 - n_2/\cos\theta_2}{n_3/\cos\theta_3 + n_2/\cos\theta_2} \quad (4)$$

$$t_{12} = \frac{2\sqrt{\varepsilon_1}/\cos\theta_2}{n_2/\cos\theta_2 + \sqrt{\varepsilon_1}/\cos\theta_1} \quad (5)$$

$$t_{23} = \frac{2n_2/\cos\theta_3}{n_3/\cos\theta_3 + n_2/\cos\theta_2} \quad (6)$$

2.3. 광학자취

광학자취는 생체분자 간 반응의 결과 센서에서 측정되는 신호의 크기를 나타내는 양으로서, 표면 플라스몬 공명 센서의 경우 근접장 표면파와 생체분자 분포 간의 중복적분(overlap integral)에 의하여 기술된다. 본 연구에서 중복적분은 다음과 같이 여러 가지 방법으로 정의하였다.

$$O(1) = \int \varepsilon(r)|E_x(r)|^2 dr \quad (7)$$

$$O(2) = \int \varepsilon(r)|H_y(r)|^2 dr \quad (8)$$

$$O(3) = \int \varepsilon(r)|E_z(r)|^2 dr \quad (9)$$

$$O(4) = \int \varepsilon(r)|E(r)|^2 dr \quad (10)$$

$$O(5) = \int \varepsilon(r)|S_x(r)|dr \quad (11)$$

$$O(6) = \int \varepsilon(r)|S_z(r)|dr \quad (12)$$

$$O(7) = \int \varepsilon(r)|S(r)|^2 dr \quad (13)$$

이때, ε(r)은 생체분자의 분포에 기인한 유전율의 공간변화를 가리킨다. 적절한 적분한계를 고려하면 O(1)의 중복적분을 기반으로 한 광학자취는 다음 식과 같이 주어진다.

$$O(1) = \int_0^{d2} \varepsilon_2(z)|E_{2x}(z)|^2 dz + \int_{d2}^{\infty} \varepsilon_3(z)|E_{3x}(z)|^2 dz \quad (14)$$

여기서 z=0은 금속 박막의 표면을 의미하며, O(2)~O(7)의 경우도 근접장 값을 제외하고는 동일한 형태를 띠게 된다. 본 연구에서는 IgG간 상호작용에 대하여 기존에 발표된 실험결과를 바탕으로 가장 상관관계가 높은 광학자취의 정의를 찾아내고자 하였다.

III. 결과 및 토론

그림 2는 측정된 표면 플라즈몬 공명각 변화와 계산된 광학자취의 결과를 나타낸다. 그림 2(a)의 경우 금 박막(Bare gold)으로부터 a-h-IgG, a-h-IgG/h-IgG, a-h-IgG/h-IgG/a-h-IgG의 순서로 분자간 반응이 진행됨에 따라 공명각이 커지고, 아울러 광학적 자취가 증가하는 것을 알 수 있다. 그림 2(b)에 보여지는 역샌드위치 어세이의 경우도 마찬가지로 반응의 진행에 따라 공명각과 광학자취가 증가한다. 이는 반응이 진행함에 따라 생체분자간 반응에 의한 굴절율 값 또는 적층에 따른 반응 층의 두께가 증가하고 또한 표면 전자기파의 세기가 커지면서 중첩에 의한 광학자취가 커지기 때문이다. 즉, 식 (14)에서 ε(z)와 E(z)의 공간적분으로 주어지는 광학

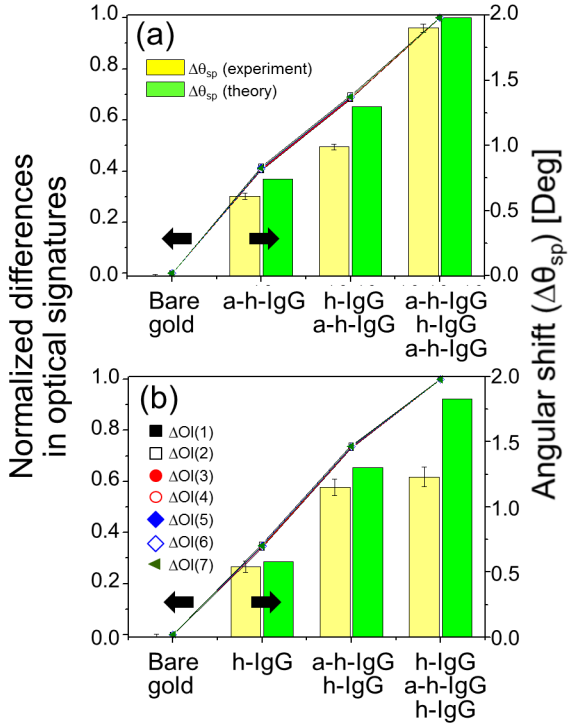

FIG. 2. Normalized differences in optical signatures (left axis) and angular shifts that were calculated theoretically and experimentally measured (right axis): (a) reverse sandwiched and (b) sandwiched assay.

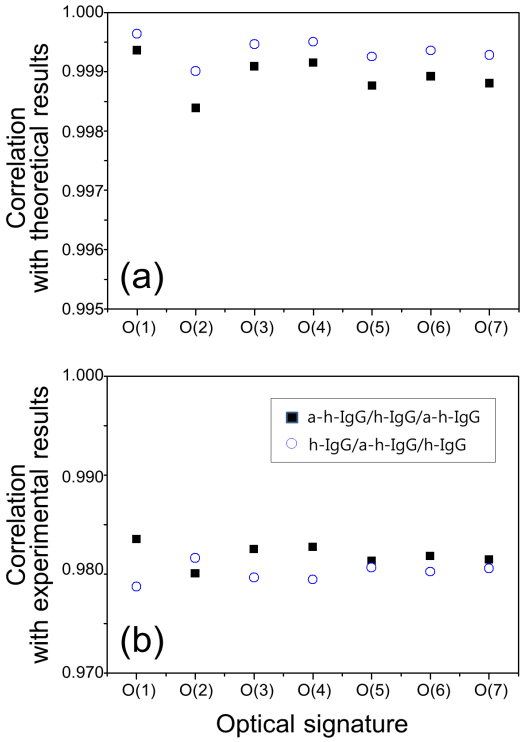

FIG. 3. Correlation coefficients: (a) with theoretical results and (b) experimental data. Symbols of filled squares (■) and open circles (○) are for sandwiched and reverse sandwiched assays, respectively.

적 자취는 전기장과 두께가 증가하면서 커지는 것을 알 수 있다. h-IgG, a-h-IgG와 버퍼는 모두 광학적 유전체이므로 식 (7)-(13)을 의하여 정의된 O(1)~O(7)은 z축 방향으로 증가하고 공명각 변화($\Delta\theta_{sp}$)와 양의 상관관계를 나타낼 것이므로, 그 결과 중첩의 차이(ΔO) 또는 생체분자간 반응에 의한 광학자취는 공명각 변화에 의하여 나타내어지는 측정감도와 높은 상관관계를 가질 것으로 예측 가능하다. 그림 2에서는 이와 같이 광학자취와 이론적인 측정감도가 일치함을 확인하고 있다. 그림 2(b)에서 실험적으로 측정된 공명각 차이가 이론적으로 예측되는 만큼 커지지 않는 것은 단백질이 버퍼 내에서 표면에 바인딩 할 때 입체 장애(steric hindrance)가 발생하고, 이로 인하여 반응 면적(surface coverage)이 감소하기 때문으로 판단된다.

그림 3은 식(7)-(13)에서 정의된 광학적 자취와 공명각 또는 측정감도 사이의 상관계수를 나타낸다. 본 상관계수는 반응에 수반하는 광학자취와 공명각의 차이를 벡터로 만든 후 피어슨 상관계수(Pearson's correlation coefficient)를 계산하는 방법으로 도출하였다. 그림 3(a) 및 3(b)의 결과는 far-field에서 계산된 공명각 변화와 비교해 볼 때 모든 광학자취 O(1)~O(7)에 대해서 0.998 이상의 상관계수를 보여 주고 있으며, 실험치와 비교하는 경우에도 0.97 이상의 높은 상관관계가 나타나고 있다. 이론적 역샌드위치 어세이(h-IgG/a-h-IgG/h-IgG)의 경우가 샌드위치 어세이(a-h-IgG/h-IgG/a-h-IgG)보다 약간 높게 나타났다. 이는 a-h-IgG층의 두께는 9 nm, h-IgG층의 두께는 7 nm로 가정하였기 때문에 역샌드위치 어세이의 두께가 샌드위치 어세이의 두께보다 작아지므로 상대적인 중첩의 효과가 적어지는 반면, 반응에 따른 광학자취의 차이는 적어지기 때문에 발생하는 것으로 여겨진다. 재미있는 사실은 샌드위치 어세이와 역샌드위치 어세이 모두 광학자취의 정의에 따른 일정한 차이가 나타났다. 특히, O(1)의 값이 다른 정의에 비하여 크게 나타난 것을 볼 수 있는데, 이는 E_x 성분이 접선방향의 전기장 성분으로서 계면에서의 연속성과 관련이 있는 것으로 판단되며, 격자를 이용한 표면 플라스몬 공명 센서의 경우에 대해서도 계면 상에서 연속적인 E_x를 기반으로 한 중복적분이 가장 큰 상관성이 있다는 기존의 연구결과와 일치한다.[26] 아울러, 이것은 섭동이론(perturbation theory)에 따라 유도된 중복적분과도 일치하는 결과이다.[24] 그림 3(b)에 나오는 실험치의 경우, 샌드위치 어세이의 광학자취는 이론치에 대한 상관계수에서 보이는 광학자취와 동일한 분포를 보이지만 역샌드위치 어세이는 대조적인 분포를 보이는 것을 알 수 있다. 이는 역샌드위치 어세이의 마지막 단계인 a-h-IgG 반응 실험에서 실험적으로 측정된 값이 이론적으로 예측된 값보다 적게 나왔기 때문인 것으로 보인다.

샌드위치 어세이의 경우에 대하여 계산된 근접장 분포를 그림 4에 도식화 하였다. 유리 기판에서는 정상파(standing wave)가 만들어지고, 금속 층에서는 표면 플라스몬의 형성에 따른 전자장의 증폭(enhancement)과 반응 층 및 버퍼 층에서 소실(evanescent)되는 것을 볼 수 있다. 기판과 금속 층에서

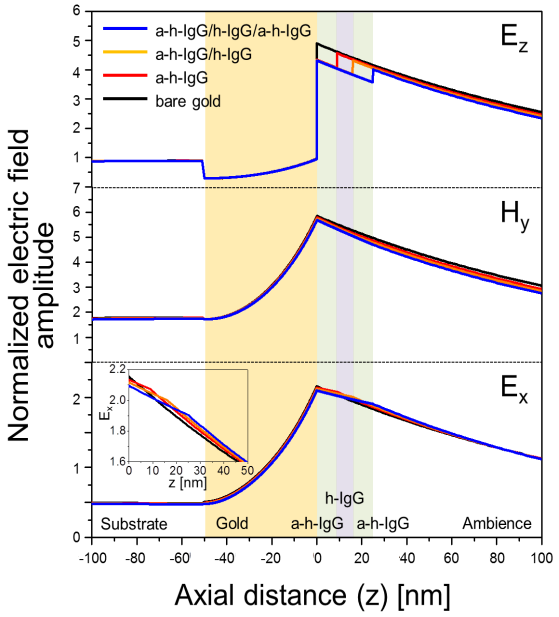

FIG. 4. Calculated near-field distribution as immobilization of a-h-IgG and subsequent bindings of h-IgG and a-h-IgG occurs in sandwiched assays. Inset magnifies E_x in the binding layers and ambient buffer near the interface. The fields were calculated assuming unit incident electric field amplitude. H_y is normalized by vacuum characteristic impedance $\eta = (\mu_0/\varepsilon_0)^{1/2}$.

는 E_x, H_y, E_z 모두 거의 변화가 없으며, 반응에 따른 대부분의 변화는 반응 층과 버퍼 층에서 일어나고 있음을 알 수 있고 이는 광학자취에 대한 식(14)의 정의를 정당화 한다. 계면에 접선 성분인 E_x는 연속적으로 주어지는 것을 확인할 수 있으며, 반응 층을 확대한 부분도(inset)에서 볼 수 있는 것처럼 반응 층 내에서는 항체-항원 반응이 일어나면서 E_x 값이 감소하지만 버퍼가 이루는 ambience 층에서는 그 값이 증가하는 것을 알 수 있다. 즉, 항체-항원 반응에 의한 E_x(a-h-IgG/h-IgG/a-h-IgG)와 반응이 전혀 없는 E_x(bare)의 비(ratio)를 보면 금속 표면에서 E_x(a-h-IgG/h-IgG/a-h-IgG)/E_x(bare)=0.97인데 반하여 반응 층과 버퍼의 계면인 25 nm 위에서는 1.13으로, 반응의 결과 ambience 층에서 E_x가 증가한다. 반응에 따른 E_x의 차이는, 버퍼 층에서의 E_z에 비하여 반응 층에서 E_z가 크게 감소하는 것과 비교한다면 미미한 것으로 보일 수 있으나 측정값과의 상관관계는 덜하지 않았다. 따라서, 진폭의 변화에 따른 공명차(resonance shift)의 예측가능성은 오히려 상대적으로 크다고 할 수 있다.

그림 2-4의 결과로 미루어볼 때, 근접장 분포가 표면 플라스몬 공명 센서의 감도에 커다란 영향을 미치고 있으며, 따라서 센서 구조의 변경을 통한 근접장 패턴의 최적화를 통하여 측정하고자 하는 분자 분포의 동시국소화를 이루어내는 방법으로 감도의 증가를 가져올 수 있음을 알 수 있다. 이와 같은 방법으로 얻어낼 수 있는 궁극적인 측정 감도는 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다. 아울러 다양한 광학자취 모델에 대하여 E_x에 근거한 광학자취의 경우 측정감도와 우수한 상관관계를 가진다는 이론적 결과를 확인하였으나 실험적 결과에 근거하는 만큼 이론적으로 예측되는 것처럼 분명하게 드러나지는 않는 것을 알 수 있다.

IV. 결 론

본 연구에서는 분자분포와 표면 전자기파의 공간적 중첩에 의하여 나타나는 광학자취와 표면 플라스몬 공명 센서의 측정감도 사이의 상관관계를 확인 하였다. 특히 계면과 접선방향인 전기장 성분(E_x)으로 정의되는 광학자취의 경우 높은 상관관계를 갖는 것을 확인할 수 있었고 이는 접선방향 전기장 성분의 연속성 때문인 것으로 보인다. 근접장에서 계산된 광학자취는 표면 공명 센서의 공명각 변화에 대해서 실험치와 97% 이상의 상관관계를 보였다. 본 연구의 결과는 추후 나노 구조를 기반으로 전자기 표면파의 국소화를 이용한 표면 플라스몬 공명 센서가 구현할 수 있는 궁극적 측정한계를 평가하는 데 유용할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 중견연구자 도약연구지원사업(2011-0017500)을 통한 교육과학기술부의 지원으로 수행되었다.

References

1. S. Kubitschko, J. Spinke, T. Brückner, S. Pohl, and N. Oranth, “Sensitivity enhancement of optical immunosensors with nanoparticles,” Anal. Biochem. **253**, 112-122 (1997).
2. L. He, M. D. Musick, S. R. Nicewarner, F. G. Salinas, S. J. Benkovic, M. J. Natan, and C. D. Keating, “Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization,” J. Am. Chem. Soc. **122**, 9071-9077 (2000).
3. S. Moon, Y. Kim, Y. Oh, H. Lee, H. C. Kim, K. Lee, and D. Kim, “Grating-based surface plasmon resonance detection of core-shell nanoparticle mediated DNA hybridization,” Biosens. Bioelectron. **32**, 141-147 (2012).
4. B. Sepúlveda, A. Calle, L. M. Lechuga, and G. Armelles, “Highly sensitive detection of biomolecules with the magneto-optic surface-plasmon-resonance sensor,” Opt. Lett. **31**, 1085-1087 (2006).
5. J. Oh, Y. W. Chang, S. Yoo, D. J. Kim, S. Im, Y. J. Park, D. Kim, and K.-H. Yoo, “Carbon nanotube-based dual mode biosensor for electrical and surface plasmon resonance measurements,” Nano Lett. **10**, 2755-2760 (2010).
6. P. P. Markowicz, W. C. Law, A. Baev, P. N. Prasad, S. Patskovsky, and A. Kabashin, “Phase-sensitive time-modulated surface plasmon resonance polarimetry for wide dynamic range biosensing,” Opt. Express **15**, 1745-1754 (2007).
7. H. P. Ho, W. Yuan, C. L. Wong, S. Y. Wu, Y. K. Suen,

S. K. Kong, and C. Lin, "Sensitivity enhancement based on application of multi-pass interferometry in phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor," Opt. Commun. **275**, 491-496 (2007).
8. A. R. Halpern, Y. Chen, R. M. Corn, and D. Kim, "Surface plasmon resonance phase imaging measurements of patterned monolayers and DNA adsorption onto microarrays," Anal. Chem. **83**, 2801-2806 (2011).
9. K. M. Byun, S. J. Kim, and D. Kim, "Design study of highly sensitive nanowire-enhanced surface plasmon resonance biosensors using rigorous coupled wave analysis," Opt. Express **13**, 3737-3742 (2005).
10. K. M. Byun, S. J. Yoon, D. Kim, and S. J. Kim, "Experimental study of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance biosensors by use of periodic metallic nanowires," Opt. Lett. **32**, 1902-1904 (2007).
11. L. Malic, B. Cui, T. Veres, and M. Tabrizian, "Enhanced surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization an periodic gold nanoposts," Opt. Lett. **32**, 3092-3094 (2007).
12. K. Kim, D. J. Kim, S. Moon, D. Kim, and K. M. Byun, "Localized surface plasmon resonance detection of layered biointeractions on metallic subwavelength nanogratings," Nanotechnol. **20**, 315501 (2009).
13. H. Yu, K. Kim, K. Ma, W. Lee, J.-W. Choi, C.-O. Yun, and D. Kim, "Enhanced detection of virus particles by nanoisland-based localized surface plasmon resonance," Biosens. Bioelectron. **41**, 249-255 (2013).
14. K. Kim, J.-W. Choi, K. Ma, R. Lee, K.-H. Yoo, C.-O. Yun, and D. Kim, "Nanoislands-based random activation of fluorescence for visualizing endocytotic internalization of adenovirus," Small **6**, 1293-1299 (2010).
15. K. Kim, Y. Oh, W. Lee, and D. Kim, "Plasmonics-based spatially activated light microscopy for super-resolution imaging of molecular fluorescence," Opt. Lett. **35**, 3501-3503 (2010).
16. K. Kim, J. Yajima, Y. Oh, W. Lee, S. Oowada, T. Nishizaka, and D. Kim, "Nanoscale localization sampling based on nanoantenna arrays for super-resolution imaging of fluorescent monomers on sliding microtubules," Small **8**, 892-900 (2012).
17. K. M. Byun, S. M. Jang, S. J. Kim, and D. Kim, "Effect of target localization on the sensitivity of a localized surface plasmon resonance biosensor based on subwavelength nanostructures," J. Opt. Soc. Am. A **26**, 1027-1034 (2009).
18. X. D. Hoa, A. G. Kirk, and M. Tabrizian, "Enhanced SPR response from patterned immobilization of surface bioreceptors on nano-gratings," Biosens. Bioelectron. **24**, 3043-3048 (2009).
19. K. Ma, D. J. Kim, K. Kim, S. Moon, and D. Kim, "Target-localized nanograting-based surface plasmon resonance detection toward label-free molecular biosensing," IEEE J. Select. Topics Quantum Electron. **16**, 1004-1014 (2010).
20. W. Lee, Y. Oh, and D. Kim, "Enhanced detection sensitivity of surface plasmon resonance biosensing based on co-localized target molecules and evanescent fields," Korean J. Opt. Photon. (Hankook Kwanghak Hoeji) **22**, 198-203 (2011).
21. C. Hahn, C.-H. Oh, and S. H. Song, "Surface plasmon modes confined in the gap between metal nanowire and dielectric slab," Korean J. Opt. Photon. (Hankook Kwanghak Hoeji) **22**, 269-275 (2011).
22. Y. Kim, K. Chung, W. Lee, D. H. Kim, and D. Kim, "Nanogap-based dielectric-specific colocalization for highly sensitive surface plasmon resonance detection of biotin-streptavidin interactions," Appl. Phys. Lett. **101**, 233701 (2012).
23. Y. Oh, W. Lee, and D. Kim, "Co-localization of gold nanoparticle-conjugated DNA hybridization for enhanced surface plasmon detection using nanograting antennas," Opt. Lett. **36**, 1353-1355 (2011).
24. A. Shalabney and I. Abdulhalim, "Electromagnetic fields distribution in multilayer thin film structures and the origin of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance sensors," Sens. Actuators A **159**, 24-32 (2010).
25. N.-H. Kim, W. K. Jung, and K. M. Byun, "Correlation analysis between plasmon field distribution and sensitivity enhancement in reflection- and transmission-type localized surface plasmon resonance biosensors," Appl. Opt. **50**, 4982-4988 (2011).
26. W. Lee and D. Kim, "Field-matter integral overlap to estimate the sensitivity of surface plasmon resonance biosensors," J. Opt. Soc. Am. A **29**, 1367-1376 (2012).
27. Y. Ryu, S. Moon, Y. Oh, Y. Kim, and D. Kim, "An experimental correlation study between field-target overlap and sensitivity of surface plasmon resonance biosensors based on sandwiched immunoassays," Opt. Commun. **285**, 4626-4631 (2012).
28. F. Vollmer and S. Arnold, "Whispering-gallery-mode biosensing: labelfree detection down to single molecules," Nature Methods **5**, 591-596 (2008).
29. E. D. Palik, *Handbook of Optical Constants of Solids* (Academic Press, Orlando, FL, USA, 1985).
30. J. Vörös, "The density and refractive index of adsorbing protein layers," Biophys. J. **87**, 553-561 (2004).
31. C. Preininger, H. Clausen-Schaumann, A. Ahluwalia, and D. de Rossi, "Characterization of IgG Langmuir–Blodgett films immobilized on functionalized polymers," Talanta **52**, 921-930 (2000).
32. A. J. A. El-Haija, "Effective medium approximation for the effective optical constants of a bilayer and a multilayer structure based on the characteristic matrix technique," J. Appl. Phys. **93**, 2590-2594 (2003).
33. N. J. Geddes, A. S. Martin, F. Caruso, R. S. Urquhart, D. N. Furlong, J. R. Sambles, K. A. Than, and J. A. Edgar, "Immobilisation of IgG onto gold surfaces and its interaction with a-h-IgG studied by surface plasmon resonance," J. Immunol. Methods **175**, 149-160 (1994).
34. A. K. Ghatak and K. Thyagarajan, *Optical Electronics* (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1989).