

Real-time Highly Sensitive Measurement of Myocardial Infarction Biomarkers Using Silicon-based Ellipsometric Biosensors

Yoon Gi Min¹, Hyun Mo Cho², and Jae Heung Jo^{1†}

¹Department of Photonics and Sensors / Department of Computer, Communication and Unmanned Technology, Graduate School, Hannam University, 70 Hannam-ro, Daeduk-gu, Daejeon 34430, Korea

²Semiconductor Integrated Metrology Team, Korea Research Institute of Standards and Science, 267 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34113, Korea

(Received January 2, 2019; Revised March 25, 2019; Accepted March 29, 2019)

We report highly sensitive detection of myocardial infarction biomarkers, such as myoglobin and cTnI, within several hundred seconds using a rotating-analyzer ellipsometer and a biosensor with biochips fabricated on a SiO₂-coated tilted silicon substrate. We choose the running buffer to be pure phosphate-buffered saline (PBS) or 10% mixed human serum. When we choose the running buffer to be pure PBS, we obtain diagnostic densities of pure myocardial infarction biomarkers of up to 1 ng/ml and 5 pg/ml respectively. Meanwhile, when we use PBS with 10% human serum, the measured densities of myoglobin and cTnI were up to 1 ng/mL and 1 pg/mL respectively. The measured diagnostic densities are less than 1/15 and 1/80 (in cases of myoglobin and cTnI respectively) of those referenced by the World Health Organization.

Keywords: Ellipsometer, Biosensor, Myocardial infarction biomarker

OCIS codes: (120.2130) Ellipsometry and polarimetry; (170.1420) Biology; (170.1470) Blood or tissue constituent monitoring; (240.2130) Ellipsometry and polarimetry

실리콘 기반 타원편광계식 바이오센서를 이용한 심근경색 생체표지자의 실시간 초고감도 진단 농도 측정

민윤기¹ · 조현모² · 조재흥^{1†}

¹한남대학교 대학원 광·센서공학과 / 컴퓨터통신무인기술학과
Ⓧ 34430 대전광역시 대덕구 한남로 70

²한국표준과학연구원 첨단측정장비연구소 반도체측정장비팀
Ⓧ 34113 대전광역시 유성구 가정로 267

(2019년 1월 2일 받음, 2019년 3월 25일 수정본 받음, 2019년 3월 29일 게재 확정)

2° 기울어진 산화막 코팅 실리콘 기판의 바이오칩과 프리즘으로 제작한 바이오센서와 검광자 회전 타원편광계를 이용하여 심근경색 생체표지자인 미오글로빈과 cTnI의 진단 농도를 수백 초 내에 실시간 초고감도로 측정하는데 성공하였다. 러닝 버퍼로는 순수한 phosphate buffered saline (PBS) 또는 PBS에 10% 인간 혈청을 섞은 러닝 버퍼를 사용하였다. PBS 조건에서는 미오글로빈과 cTnI가 각각 1 ng/mL와 5 pg/mL로 측정되었으며, PBS에 인간 혈청을 10% 섞은 조건에서는 미오글로빈과 cTnI는 각각 1 ng/mL과 1 pg/mL로 측정되었다. 이러한 심근경색 생체표지자의 진단 농도는 현재 제시된 세계보건기구의 심근경색 진단 기준 농도보다 미오글로빈은 1/15배 낮고, cTnI는 1/80배 낮다.

Keywords: 타원편광계, 바이오센서, 심근경색 생체표지자

OCIS codes: (120.2130) Ellipsometry and polarimetry; (170.1420) Biology; (170.1470) Blood or tissue constituent monitoring; (240.2130) Ellipsometry and polarimetry

[†]E-mail: jhjo@hnu.kr, ORCID: 0000-0002-0699-8073

Color versions of one or more of the figures in this paper are available online.

I. 서 론

타원편광계측법은 박막의 물성을 규명할 뿐만 아니라 생체 물질의 고정화 및 고정화된 생체 물질과 생체표지자 간의 상호작용을 계측할 수 있는 방법으로 최근에 집중적으로 연구되고 있다¹¹. 바이오 센서는 바이오 물질의 고유 특성인 선택적 반응을 활용하여 반응 상태 및 농도를 측정하여 신약개발 검출 도구 및 임상 진단 등에 유용하게 사용할 수 있다. 바이오센서를 이용한 생체물질의 결합 특성을 측정한 일반적인 기술은 샌드위치 효소결합 면역흡착검사법과 표면 플라즈몬 공명법이 있다^{1,2}. 샌드위치 효소결합 면역흡착검사법은 효소면역실험법 중 하나로 효소를 이용하여 항원-항체 접합동특성을 측정하는데, 이 방법의 문제점은 측정을 위한 전처리 과정이 매우 길어 실시간 측정이 어렵다는 점과 접합동 특성을 직접적으로 측정할 수 없어서 측정 불확도가 크다는 것이다. 그리고 표면 플라즈몬 공명법은 측정 감응곡선으로 러닝 버퍼(running buffer)의 굴절률과 바이오 물질 사이의 접합동특성이 분리되지 않은 채로 측정되어 이를 보정할 기준 채널이 별도로 필요하며, 기준 채널의 측정값을 통해 측정 감응 곡선을 보정해야 되기 때문에 측정 감도와 측정 불확도에 대한 구조적인 문제가 있다². 또한 이 방법은 측정에 사용되는 센서의 가격이 매우 높다는 문제점이 있다³. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 최근에는 박막의 두께 측정 민감도와 측정불확도를 높인 실리콘 기판을 사용한 검광자 회전 타원편광계가 연구되고 있다^{4,5}.

심근경색 진단에 대한 가이드라인은 1994년 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서 특징적인 심근 허혈 증상인 흉통 발생, 심근 효소의 상승, 심전도 검사(electrocardiography, ECG)상의 Q파 패턴발생 중 2가지 이상의 소견으로 제시하였다^{6,7}. 이후 심근경색 진단 가이드라인은 2000년 유럽심장학회/미국심장학회 합동 위원회에서 심근 괴사의 예민도 및 특이도가 높은 생·화학적 생체표지자의 소견이 있을 때, 추가적으로 특징적인 심근 허혈 증상인 흉통 발생, ECG상의 Q파 패턴 발생, ECG상의 허혈 패턴 중 1가지 이상의 소견으로 제시하였다^{8,9}. 2000년 유럽심장학회/미국심장학회 합동 위원회에서는 심근경색 생체표지자로는 미오글로빈(myoglobin)과 cTnI (cardiac troponin I)를 제시하였다^{8,9}. 미오글로빈은 cTnI보다 혈액 내 가장 먼저 증가하여 심근경색 조기 진단에 중요한 생체표지자다. 그러나 미오글로빈은 심근 및 골격근에 존재하는 heme-protein으로 심근에 대한 특이도가 낮아 단일 심근경색 진단 생체표지자로 사용되기보다 보조 생체표지자로 cTnI와 함께 사용된다⁸⁻¹¹. 미오글로빈의 심근경색 진단 기준 농도는 15~120 ng/mL이다¹¹. cTn (cardiac troponin)은 심근의 수축과 이완에 관여하는 동위 단백질로 cTnT, cTnI, cTnC로 분류된다. 그 중 cTnI는 심근괴사 경우에만 혈액 내 증가하는 심근에 대한 특이도와 심근 허혈 증상인 흉통 발생 후 혈액 내 급격하게 증가하는 심근에 대한 예민도가 미오글로빈보다 높아 심근경색 진단에 가장 주요한 생체표지자다. cTnI의 심근경색 진단 기준 농도는

0.08 ng/mL이다¹¹.

본 논문에서는 실리콘 기판을 2° 기울여서 프리즘과 결합시킨 바이오칩과 유리 프리즘으로 제작한 바이오센서와 검광자 회전 타원편광계를 이용하여 심근경색의 사전적 진단을 하는데 사용하는 생체표지자인 미오글로빈과 cTnI의 진단 농도를 실시간 고감도로 측정하고자 한다. 이때 러닝 버퍼(running buffer)로 순수한 PBS (phosphate buffered saline)를 사용하여 제작된 바이오센서의 성능을 확인한 후, PBS에 인간 혈청을 10% 섞어서 러닝 버퍼를 사용하여 심근경색 생체표지자의 진단 농도를 측정하고자 한다.

II. 검광자 회전 타원편광계 이론

타원편광계의 타원편광 계측각인 ψ 와 Δ 는 등방성 단일 평면에 대한 프레넬 방정식을 이용하면 각각 p -파와 s -파의 반사계수인 r_p 와 r_s 의 비율인 복소 반사계수비 ρ 로 다음과 같이 표현할 수 있다^{12,13}.

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \frac{|r_p|}{|r_s|} \exp[i(\delta_{rp} - \delta_{rs})] = \tan\psi \exp(i\Delta) \quad (1)$$

$$\begin{bmatrix} \psi \\ \Delta \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \tan^{-1} \left| \frac{r_p}{r_s} \right| \\ \delta_{rp} - \delta_{rs} \end{bmatrix} \quad (2)$$

여기서 δ_{rp} 와 δ_{rs} 는 각각 p -파와 s -파의 위상이다.

그림 1은 검광자 회전 타원편광계의 개념을 설명하는 개략도로 편광자(polarizer), 샘플(sample), 검광자(analyzer)를 표시하였다. 여기에서 회전은 검광자(analyzer)가 하는 것으로 전체 검광자 회전 타원편광계는 광원, 편광자, 샘플, 검광자, 검출기로 순차적으로 구성된다. 편광의 방위각(P)과 검광자의 방위각(A)을 편광부의 투과축이 측정면에 수직하고 입사면에 평행할 때를 원점으로 빛을 바라볼 때 반시계 방향을 양의 방향으로 정의한다. 편광자와 검광자의 축은 회전 검광자의 엔코더를 원점으로 각각의 방위각 보정값(P_0, A_0)을 적용하여 일치시켰다. 광원에서 편광자로 입사하는 임의의 전기장 진폭을 E_0 라고 할 때, 검출기에 입사하는 전기장을 존스 행렬로 계산하여 검광자 회전 타원편광계에서 측정되는 빛의 복사조도 I 를 구하면 식 (3)~(5)로 표현된다^{12,13}.

$$I = I_0 [1 + \alpha' \cos 2(A - A_0) + \beta' \sin 2(A - A_0)] \quad (3)$$

$$\alpha' = \frac{\tan^2\psi - \tan^2(P - P_0)}{\tan^2\psi + \tan^2(P - P_0)} \quad (4)$$

$$\beta' = \frac{2 \tan\psi \cos\Delta \tan(P - P_0)}{\tan^2\psi + \tan^2(P - P_0)} \quad (5)$$

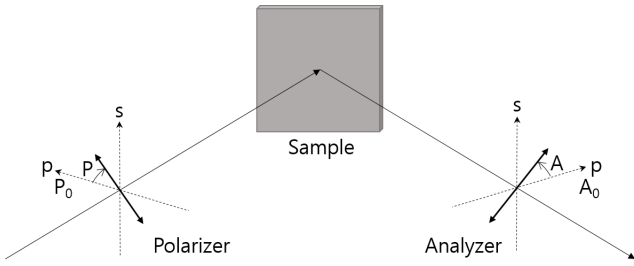


Fig. 1. Schematic diagram of the rotating analyzer ellipsometer.

타원편광 계측각인 ψ 와 Δ 은 식 (3)에서 2개의 푸리에 계수인 α' 과 β' 에 대한 정보를 포함하고 있고, 이 푸리에 계수인 식 (4)와 식 (5)를 이용하면 타원계측각은 각각 다음과 같이 표현된다.

$$\Psi = \tan^{-1} \left[\sqrt{\frac{1+\alpha'}{1-\alpha'}} \tan(P-P_0) \right] \quad (6)$$

$$\Delta = \pm \cos^{-1} \sqrt{\frac{\beta'^2}{1-\alpha'^2}} \quad (7)$$

본 논문에서 사용한 바이오센서의 단일 박막 두께와 굴절률은 단일박막 모델인 (공기/박막/기판)에서 측정된 타원편광 계측각을 통해 계산한다. 단일박막 모델에서 ρ 는 다음과 같다^[12,13].

$$\rho = \tan\Psi \exp(i\Delta) = \frac{r_{0,p} + r_{1,p} \exp(-i2\beta_1)}{1 + r_{0,p} r_{1,p} \exp(-i2\beta_1)} \frac{r_{0,s} + r_{1,s} \exp(-i2\beta_1)}{1 + r_{0,s} r_{1,s} \exp(-i2\beta_1)} \quad (8)$$

여기서 $r_{0,p}$ 와 $r_{0,s}$ 는 각각 p -파와 s -파에 대한 공기/박막 사이의 반사계수이고, $r_{1,p}$ 와 $r_{1,s}$ 는 각각 p -파와 s -파에 대한 박막/기판의 경계면에 의한 반사 계수이며, β_1 는 박막/기판 사이의 위상차이다. 이들은 모두 공기의 굴절률 n_0 , 박막에 해당하는 런닝버퍼의 굴절률 n_1 , 기판에 해당하는 바이오칩의 굴절률 n_2 , 입사광의 박막 입사각 θ_0 , 광원의 파장 λ , 박막의

두께 d_1 의 함수이다. 여기에서 $n_0, n_2, \theta_0, \lambda$ 는 실험에서 이미 알고 있는 상수이며, n_1 과 d_1 을 실험적으로 구하여야 한다. 즉 최소자승의 최적화 방법을 사용하여 타원편광 계측각의 측정값(Ψ_{exp}, Δ_{exp})과 식 (8)로부터 구한 이론값(Ψ_{cal}, Δ_{cal})의 편차가 최소가 될 때, 박막의 두께(d_1)와 굴절률(n_1)을 계산하여 구하면 된다. 일반적으로 투명 박막에 대한 검광자 회전 타원편광계 실험은 입사각이 브루스터 각인 $\theta_0 = \theta_B$ 일 때, 가장 신뢰성 있는 데이터를 얻을 수 있다.

III. 실험 장치 및 실험 방법

3.1. 타원편광계식 바이오센서 구성

그림 2는 나노미터 수준의 박막 두께를 측정하는 광원 (laser), 편광자(polarizer), 샘플 스테이지(sample stage), 회전 검광자(rotating analyzer), 검출기(detector)로 구성된 검광자 회전 타원편광계의 실험장치도이다. 무편광이며 파장 532 nm 인 반도체 레이저(UNIOTECH, GD 25) 빔이 원통렌즈를 통해 직선 빔(line beam)이 된다. 이 빔은 선편광자(THORLABS, GTH10M-A)를 거쳐서 p-편광 상태로 샘플의 실리콘 기판에서 직선 빔으로 초점을 맞춘다. 그리고 0.01°의 정확도를 갖는 고니오미터(HUBER, 2-Circle Goniometer 422)로 이 직선빔을 p-편광 무반사 조건으로 샘플 스테이지에 설치되는 바이오센서 내의 실리콘과 기판에 브루스터 각으로 입사시킨다. 이 빔은 샘플에 장착된 바이오센서의 실리콘 바이오칩에서 반사되어 타원편광상태로 회전 검광자를 통과하여 검출기(THORLABS, PDA100A-EC)에 들어간다.

검광자는 편광과 회전 검광자(THORLABS, GTH10M-A)로 구성되어 있다. 편광은 고니오미터 암의 각도 제어와 광축 정렬의 보조적인 기준점 역할을 한다. 회전 검광자는 샘플의 바이오센서에서 반사한 반사광의 편광 상태에 따른 검출기의 신호 동기화에서 타원편광 계측각을 측정하기 위한 기준 역할을 한다.

그림 3은 그림 2의 검광자 회전 타원편광계의 샘플 스테이지에 설치한 2° 기울어진 실리콘 기판으로 만든 바이오칩이 설치된 바이오센서를 확대하여 보여주는 개략도이며, 이 사진에서는 바이오센서를 잘 보여주기 위하여 옆으로 누운 모

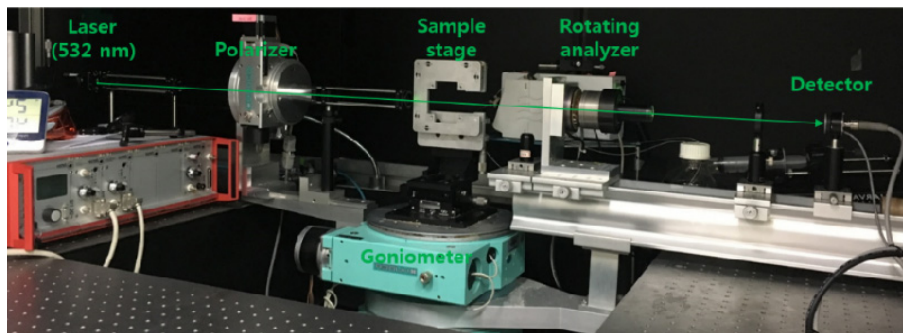


Fig. 2. Photo of the experimental setup of rotating analyzer ellipsometer with a silicon based ellipsometric biosensor.

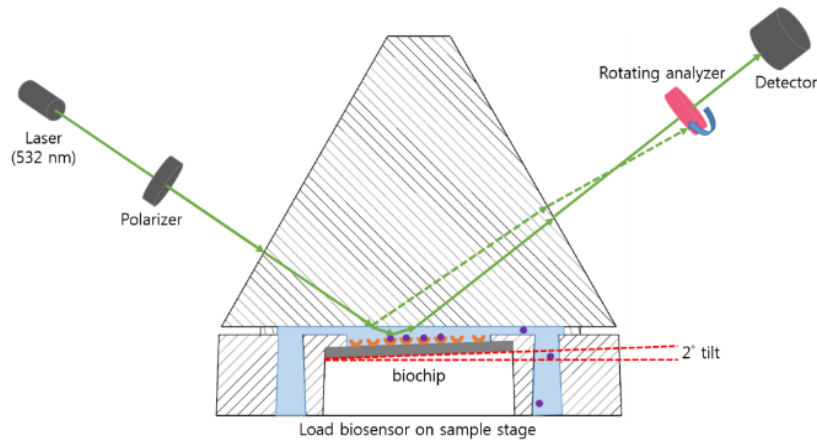


Fig. 3. Schematic diagram of the ellipsometric biosensor on the sample stage shown in Fig. 2.

습으로 사진을 찍었고 실제 사용시에는 누운 바이오센서를 수직으로 세운 후 위에서 고정틀로 바이오센서와 유로를 압착하여 밀봉시켜서 사용한다. 이 바이오센서는 프리즘과 프리즘으로부터 분리된 실리콘 기판을 유로를 사이에 두고 결합시키는 것으로 바이오 물질의 소모량 감소와 버블 제거를 손쉽게 할 수가 있다. 그러나 프리즘과 실리콘 기판을 평행하게 설치할 경우, 실리콘 기판의 윗면과 밑면에서 반사한 광이 측정용 광검출기에 입사하므로 실리콘 기판의 윗면과 유로 사이에서 반사한 광의 신호 검출이 쉽지가 않다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 BK-7 유리로 제작한 프리즘과 실리콘 기판을 2° 기울여서 미세유로판을 서로 조립하면 실리콘 기판의 윗면과 유로에서 반사한 신호광이 실리콘 기판의 밑면에서 반사한 광과는 공간적으로 완전히 분리되므로 광검출기의 핀홀을 이용하면 확실하게 신호광을 분리할 수 있다. 또한 프리즘과 기울어진 실리콘 기판 사이에 만들어진 미세유로판에 미세유로를 형성하는 이 구조는 단순한 때문에 제조 원가가 낮고, 바이오 물질의 소모량이 감소하며, 미세유로 내에서 생긴 버블을 쉽게 제거할 수 있다는 부가적인 장점도 있다. 기울기 각도를 과도하게 크게 하면 유로의 내부 단면적이 균일해지지가 않으므로 가장 적은 기울기를 유지해야한다. 본 논문에서는 구조적으로 이 값을 2도로 하였고, 이로 인하여 생기는 미세유로의 미세한 높이 증가는 미세유로판의 미세유로 자체의 구조적 높이를 낮추어 해결하였다. 미세유로판은 심근경색 생체표지자의 접합동특성 실험을 위해 유로를 구성하는 역할도 한다. 실리콘 기판, 미세유로판, 프리즘은 PDMS (polydimethylsiloxane)로 밀봉한다.

3.2. 표준시편 및 심근경색 진단용 바이오칩 제작방법

본 타원편광계의 정확도를 확인하기 위한 SiO₂ 표준시편은 한국표준과학연구원에서 시험검사(시험성적서: 1607-01238-001)가 완료된 2 nm, 5 nm, 13 nm, 50 nm 두께의 산화막 실리콘 웨이퍼를 사용하였다. 이 시편에 형성된 산화막 두께를 타원편광계로 측정하여 제공된 실리콘 기판에 형성된 산화막 두께가 일치하는지를 확인하고 이를 이용하여 본 장치의 측정

값을 교정한다.

바이오칩은 저비용이면서도 높은 표면 균질도의 p-type 단결정 실리콘 웨이퍼를 11.25 × 11.25 mm²로 절단하고, 그림 4와 같은 4단계의 표면 개조 과정을 거쳐서 바이오칩으로 바꾼다. 1단계는 HF 세정 공정으로 실리콘 웨이퍼 위에 tert-butoxycarbamate (T-Boc)을 고정하기 위한 전처리 공정으로 산화막을 제거하여 산화막 내에 포함되어 있는 불순물도 함께 제거한다. 2단계는 T-Boc 코팅 공정으로 실리콘 웨이퍼 위에 스핀 코터를 이용하여 T-Boc을 코팅한 후, 자외선을 조사하여 T-Boc을 실리콘 표면 위에 고정한다. 3단계는 -NH₂ 활성화 공정으로 T-Boc이 고정화된 실리콘 웨이퍼에 25% trifluoroacetic acid와 10% NH₄OH을 순차적으로 처리하여 -NH₂ 말단기를 형성한다. 마지막 4단계는 dextran self-assembled monolayer (dextran SAM)공정으로 -NH₂ 말단기가 형성된 실리콘 웨이퍼 위에 생체표지자 항체를 고정시키는 텍스트란(dextran)을 고정하는 과정으로 최종적으로 dextran SAM 바이오칩(줄여서 바이오칩이라고 함)이 만들어진다.

이렇게 준비된 바이오칩을 그림 3의 바이오 센서에 조립한 후, 그림 2에서 보여준 검광자 회전 타원편광계의 샘플 스테이지에 장착시키고, 실린더 펌프로 러닝 버퍼인 PBS (phosphate buffered saline)를 일정한 속도로 흘려준다. PBS는 삼투압과 이온 농도가 인간 혈액과 거의 같은 특징이 있어 생·화학적 연구에 널리 사용되는 러닝 버퍼다. 0.4 M EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide)/0.1 M NHS는 바이오칩의 표면의 카르복실기(-COOH)를 활성화시켜 항체의 아미노기(-NH₂)와 아마이드 결합(-CONH-)을 위해 주입한 후, 심근경색 항체(25 ug/ml 미오글로빈 또는 cTnI)를 고정시킨다. 그리고 이러한 항체가 결합된 활성화된 dextran SAM 표면은 항원-항체 결합 이외의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 ethanolamine을 주입한다. 최종적으로 이 전처리 과정이 끝난 심근경색 진단용 바이오칩에 측정하고자 하는 심근경색 항원을 주입하여 심근경색 생체표지자의 항원-항체 접합동특성을 통한 진단 농도를 측정한다.

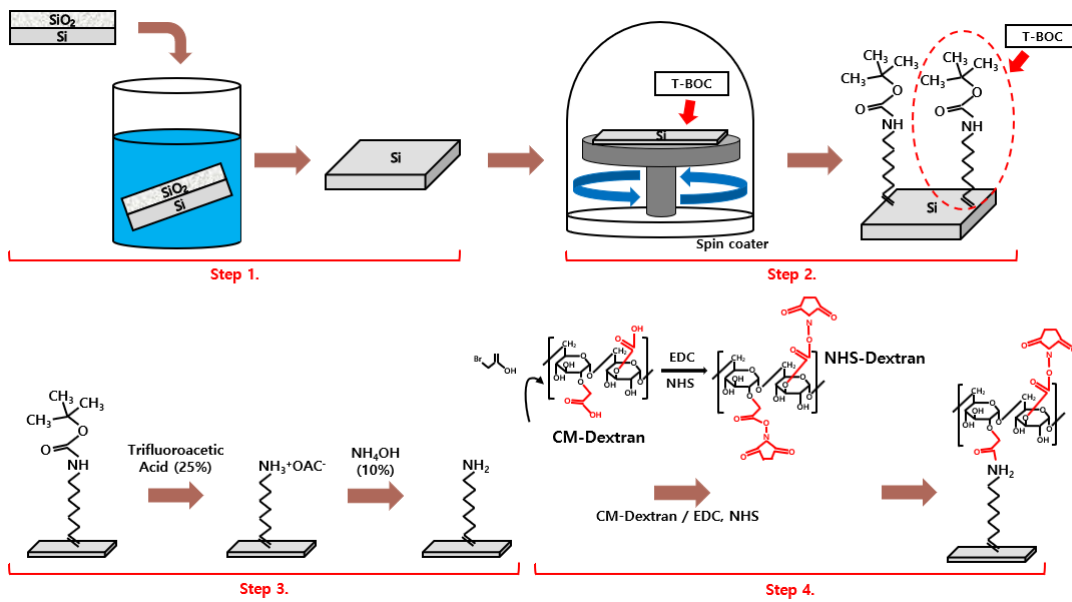


Fig. 4. Production process of the dextran SAM biochip using a silicon plate.

IV. 실험 결과 및 논의

4.1. 실험 장치 신뢰성 측정

타원편광식 바이오센서의 신뢰성 평가는 SiO₂ 표준 시편을 본 논문에서 구성한 2° 기울어진 실리콘 기판을 사용한 바이오센서용 타원편광계인 SISE (실험 장비)와 상용의 바이오센서용 타원편광계(J.A. Woollam Co., M-2000D) (상용 장비)를 사용하여 공기 조건과 PBS 조건에서 각각 실험하여 타원편광계측각의 상대 오차를 비교하였다.

Table 1. Comparison of data of ψ obtained by the theoretical calculation, the commercial instrument (M-2000), and the silicon based ellipsometric biosensor (SISE), when the air plays a role of a running buffer

Standard sample (nm)	Comparison of data ψ (degree)		
	Theoretical data (simulation)	M-2000D (experiment)	SISE (experiment)
2	12.459	12.468	12.466
13	14.472	14.351	14.352
50	29.072	29.005	29.006

Table 2. Comparison of data of ψ of a SiO₂ standard specimen obtained by using the commercial instrument (M-2000) and the silicon based ellipsometric biosensor (SISE), when PBS plays a role of a running buffer

Standard sample (nm)	Comparison of data ψ (degree)	
	M-2000D (simulation)	SISE (experiment)
2	0.866	0.8977
5	1.5282	1.5186

표 1은 공기 조건에서 2 nm, 13 nm, 50 nm 두께의 SiO₂ 표준 시편을 실험 장비(SISE)와 상용 장비(M-2000D)로 각각 측정된 타원편광 계측각 ψ 의 결과와 이론으로 계산한 ψ 값을 상호 비교한 것이다. 이론값은 시험 검사가 완료된 SiO₂ 표준 시편의 두께를 타원편광계측각으로 계산한 값이다. 이론값 대비 실험 장비로 측정된 타원편광 계측각 상대 오차는 약 0.33%이며, 상용 장치로 측정된 측정값 대비 실험 장비로 측정된 측정값의 타원편광계측각 상대 오차는 약 0.002%이다.

표 2는 PBS 조건에서 2 nm와 5 nm 두께의 표준 시편을 이용한 실험 장비로 측정된 ψ 값과 상용 장비를 이용하여 계산한 ψ 값을 상호 비교한 결과이다. 특히 상용 장비는 PBS 조건에서 표준 시편을 실험할 기술이 없어 공기 조건에서 실험한 데이터를 기반으로 J.A. Woollam Co.의 WVASE32 프로그램을 사용하여 계산을 하였다. M-2000D의 시뮬레이션 값은 실험 장비와 동일한 조건(PBS/SiO₂/Si)의 모델을 통해 계산한다. 상용 장치 대비 실험 장비의 타원편광계측각 상대 오차는 약 1.52%이다.

심근경색 생체표지자 항원-항체 접합동특성을 실험하기 위해서는 생체표지자의 양이 극미량이기 때문에 높은 두께 측정정밀도를 확보해야 한다. 그림 5는 PBS 조건에서 바이오칩을 바이오센서에 결합하여 두께 정밀도(precision)를 측정하여 실험 장비의 신호 안정성을 확인하기 위하여 외부에서 제작한 안정화된 바이오칩을 바이오센서에 결합하고, p-편광 무반사 조건에서 러닝 버퍼인 PBS를 300초 동안 100 μ L/min의 속도로 흘리면서 PBS가 바이오센서에 들어가기 전과 들어간 후의 ψ 의 비인 진폭비(amplitude ratio)와 이로부터 II장에서 설명한 방법으로 구한 PBS 두께(thickness)를 보여주는 그래프이다. PBS 조건에서 실험 장비의 두께 측정정밀도는 1×10^{-3} nm로서 공기 조건에서 상용 장치의 두께 측정정밀도인 2×10^{-3} nm와 비교하여도 매우 우수한 수준의 두께 정밀

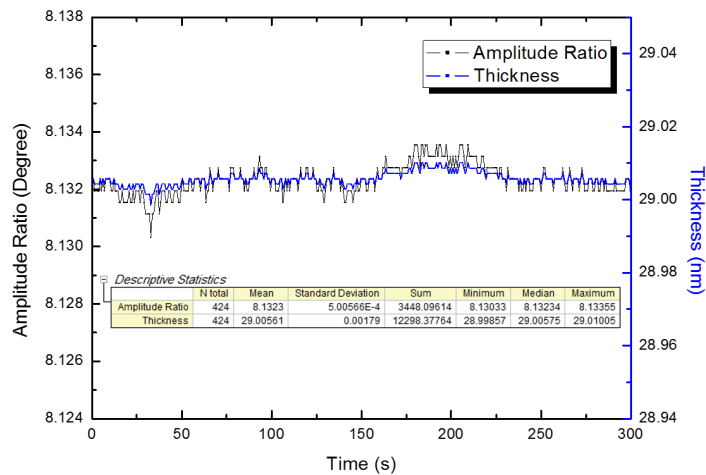


Fig. 5. Measurement precision of biochip thickness variation during 300 s when the running buffer and the correcting biochip are PBS and an external biochip, respectively.

도이다. 즉 러닝버퍼가 PBS인 조건에서 안정성이 확인된 외부 제작 바이오칩을 사용하여 측정 시스템의 두께 변화를 확인한 결과, 기존 사용제품보다 2배 정도 좋은 결과가 나왔으므로 측정시스템의 두께 변화는 거의 없다고 보면 된다.

4.2. 심근경색 생체표지자 진단 농도 측정 및 분석

그림 6은 러닝버퍼로 (a) 순수한 PBS인 경우와 (b) PBS에 인간 혈청을 10% 섞은 경우에 대한 미오글로빈의 농도를 1~50 ng/mL에서 식 (8)을 이용하여 ψ 의 시간별 진폭비 변화를 타원편광식 바이오센서로 각각 측정하는 것이다. 미오글로빈의 심근경색 진단 기준 농도는 15~120 ng/mL이므로^[11], 본 실험에서는 미오글로빈의 심근경색 진단 기준 농도에 1/15인 1 ng/mL까지 300~500초 범위 내에서 실시간 고감도로 측정이 된다는 것을 알 수가 있다. 이는 본 장치의 바이오센서가 실리콘 기판을 2° 기울여서 제작한 바이오칩을 새로이 채택

하고 유로시스템과 타원편광기에 설치하여 측정 과정을 개선한 결과이다. 그림 6(b)를 실험한 이유는 순수하게 항원만 존재하는 실험적 조건(그림 6(a)에서 더 나아가 인간 혈액과 유사한 환경에서 항원-항체 접합동특성을 확인하기 위해서이다. 다만 인간혈청을 사용할 때에는 크기가 큰 혈청 내의 덩어리 형태의 균질하지 않은 응집 물질에 의한 산란광 효과로 신호의 신호대잡음비가 나빠지므로 사전에 이를 제거하고 사용해야만 한다. 또한 PBS 조건에서 진행한 이유는 동일한 환경에서 대량 생산이 가능한 외부 제작 바이오칩의 실용화 가능성 확인을 확인하기 위해서이며, 더불어 인간 혈청은 개인마다 단백질의 함유량이 서로 다르므로 근본적으로 전처리 과정에서 규격화된 인간 혈청을 러닝 버퍼로 사용할 수 없기 때문에 전처리과정의 기준을 만들기 위해서이다.

그림 7은 러닝버퍼로 (a) 순수한 PBS인 경우와 (b) PBS에 10% 인간 혈청을 섞은 경우에 대한 심근경색 생체표지자인

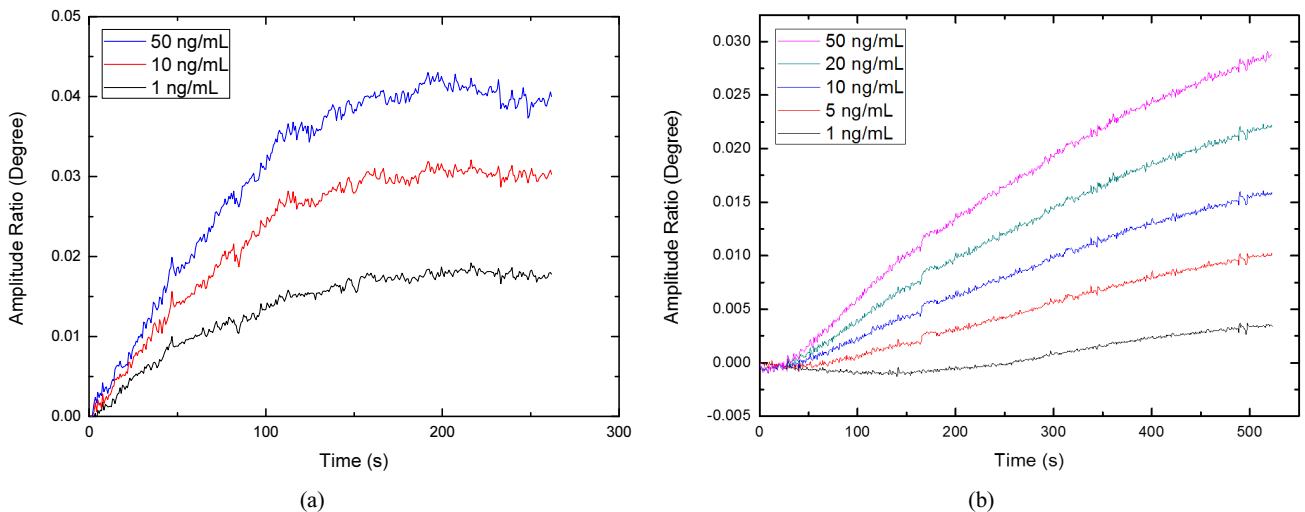


Fig. 6. Graph of the real-time super-sensitive diagnostic density of myoglobin by using the rotating analyzer ellipsometer and a biosensor with biochips fabricated by a SiO₂ coated tilted silicon substrate, when the running buffers are (a) pure PBS and (b) PBS with 10% human serum.

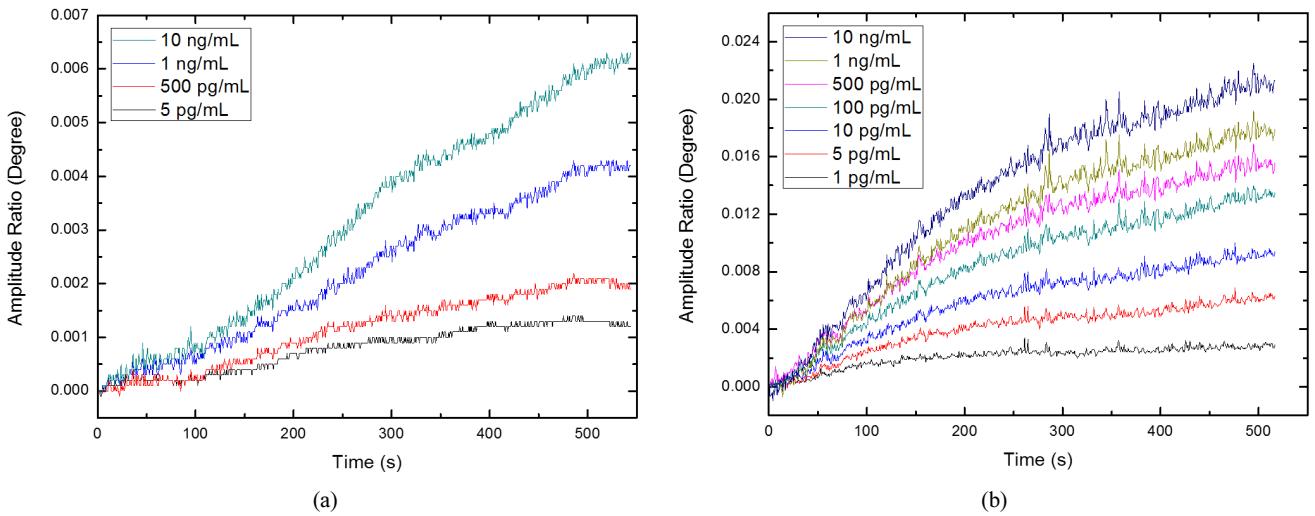


Fig. 7. Graph of the real-time super-sensitive diagnostic density of cTnI by using the rotating analyzer ellipsometer and a biosensor with biochips fabricated by a SiO₂ coated tilted silicon substrate, when the running buffers are (a) pure PBS and (b) PBS with 10% human serum.

cTnI의 농도를 1 pg/mL ~10 ng/mL에서 식 (9)를 이용하여 ψ 의 시간별 진폭비 변화를 타원편광식 바이오센서로 각각 측정하는 것이다. cTnI의 심근경색 진단 기준 농도는 0.08 ng/mL 이므로^[11], 본 실험에서는 cTnI의 심근경색 진단 기준 농도에 1/80인 1 pg/mL까지 300~500초 범위 내에서 실시간 고감도로 측정이 된다는 것을 알 수가 있다. 그러므로 심근경색 생체표지자로 주로 사용하는 미오글로빈과 cTnI의 경우에 타원편광식 바이오센서를 이용하여 실시간 초고감도로 측정이 되었기에 사전적 예방 차원에서 심근경색의 병변 관리가 진단 및 예방의학 차원에서 가능할 것으로 생각한다.

V. 결 론

본 논문은 타원편광계측 기반 2° 기울어진 실리콘 기판의 바이오센서를 이용한 실시간 고감도 심근경색 측정장치를 고안하고, 이를 이용하여 심근경색 생체표지자인 미오글로빈과 cTnI의 접합동특성을 기반으로 한 농도를 초정밀 초고감도로 측정하였다. 실시간 실험은 나노 수준의 박막 두께 실험이 가능한 타원편광계측법에 유로 시스템을 포함한 바이오센서를 접목하여 제안하였고, 고감도 실험은 p-편광 무반사 조건에서 서브 나노 수준의 심근경색 생체표지자 항원-항체 접합동특성 확인을 제안하였다.

측정 시스템은 고감도 실험을 위해 검광자 회전 타원편광계 기반의 p-편광 무반사 조건에서 구축하였다. p-편광 무반사 조건은 브루스터 각 조건으로 용액의 굴절률의 영향이 없는 상태이다. 브루스터 각을 이용한 박막 두께-타원편광계측각 관계식은 굴절률의 영향이 없는 순수한 타원편광계측각의 선형적 두께 변화를 통해 박막 두께를 nm 단위로 환산이 가능하도록 하였다. 또한 실험 장비는 실시간 실험을 위해 유로 시스템을 포함한 바이오센서를 제작하였다. 바이오센서는 프리즘 밑면 반사광을 제거하고 순수한 심근경색 생체표

지자의 항원-항체 접합동특성을 갖고 있는 바이오칩 반사광만 분리하기 위하여 2° 경사 구조로 제작하였다.

시험검사가 완료된 SiO₂ 표준 시료를 이용한 상용 장치 대비 실험값 비교와 PBS가 러닝 버퍼로서 100 μL/min의 속도로 흐르는 조건에서 바이오센서의 300~500초 사이의 두께 정밀도 측정을 통하여 측정 시스템의 신뢰성 평가를 하였다. 표준 시료를 이용한 상용 장치 대비 상대 오차는 공기 조건에서는 0.002%, PBS 조건에서는 1.52%로 확인했으며, PBS가 흐르는 조건에서 두께 정밀도는 약 1×10^{-3} nm로 공기 조건에서 상용 장치 두께 정밀도 2×10^{-3} nm와 비교하여도 우수한 실험 정밀도를 확인하였다.

그리고 실리콘 기판을 사용한 타원편광계식 바이오센서를 이용한 심근경색 생체표지자의 실시간 초고감도 진단 농도 측정 심근경색 생체표지자인 미오글로빈과 cTnI의 항원-항체 접합동특성 및 측정 농도를 확인하였다. 심근경색 진단 기준 농도는 미오글로빈의 경우 15~120 ng/mL이고, cTnI의 경우 0.08 ng/mL인데^[11], 측정 결과 이 기준 농도보다 미오글로빈과 cTnI는 각각 기준농도보다 각각 1/15배와 1/80배이다. 낮은 농도에서 항원-항체 접합동특성이 실시간 고감도로 측정되었다. 심근경색 생체표지자인 미오글로빈과 cTnI의 항원-항체 접합동특성은 러닝버퍼가 PBS일 때와 PBS에 인간 혈청 10%를 섞어서 사용할 때 모두 안정적으로 잘 측정되었다. 그러므로 본 논문에서 구성하고 제작한 타원편광식 바이오센서를 사용하면, 환자의 혈액으로부터 원하는 심근경색 생체표지자의 접합동특성만 실시간 고감도로 측정이 가능하므로 앞으로 심근경색 진단 방법으로서의 활용이 기대된다.

References

1. M. S. Diware, H. M. Cho, W. Chegal, Y. J. Cho, J. H. Jo, S. W. O, S. H. Paek, Y. H. Yoon, and D. Kim, "Solution

- immersed silicon (SIS) based biosensors: a new approach in biosensing,” *Analyst* **140**, 706-709 (2015).
2. J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, “Surface plasmon resonance sensors: review,” *Sens. Actuators, B* **54**, 3-15 (1999).
 3. Y. Tang, X. Zeng, and J. Liang, “Surface plasmon resonance: An introduction to a surface spectroscopy technique,” *J. Chem. Educ.* **87**, 742-746 (2010).
 4. G.-J. Lee, H. M. Cho, and J. H. Jo, “Measurement and analysis of the dynamics of peptide-antibody interactions using an ellipsometric biosensor based on a silicon substrate,” *Korean J. Opt. Photon.* **28**, 9-15 (2017).
 5. M. S. Diware, H. M. Cho, W. Chegal, Y. J. Cho, S. W. O, S.-H. Paek, D. S. Kim, K.-S. Kim, Y. G. Min, J. H. Jo, and C. Shin, “Label-free detection of hepatitis B virus using solution immersed silicon sensors,” *Biointerphases* **12**, 01A402 (2017).
 6. J. E. Adams III, D. R. Abendschein, and A. S. Jaffe, “Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s?,” *Circulation* **88**, 750-763 (1993).
 7. H. Tunstall-Pedoe, K. Kuulasmaa, P. Amouyel, D. Arveiler, A.-M. Rajakangas, and A. Pajak, “Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents,” *Circulation* **90**, 588-612 (1994).
 8. E. Antman, J.-P. Bassand, W. Klein, M. Ohman, J. L. Lopez Sendon, L. Rydén, M. Simoons, and M. Tendera, “Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction: The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee,” *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 959-969 (2000).
 9. F. S. Apple, R. H. Christenson, R. Valdes, A. J. Andriak, A. Berg, S.-H. Duh, Y.-J. Feng, S. A. Jortani, N. A. Johnson, B. Koplen, K. Mascotti, and A. H.B. Wu, “Simultaneous rapid measurement of whole blood myoglobin, creatine kinase MB, and cardiac troponin I by the triage cardiac panel for detection of myocardial infarction,” *Clin. Chem.* **45**, 199-205 (1999).
 10. D. A. Morrow, C. P. Cannon, R. L. Jesse, L. K. Newby, J. Ravkilde, A. B. Storow, A. H.B. Wu, and R. H. Christenson, “National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes,” *Circulation* **115**, 356-375 (2007).
 11. J. Rosenblat, A. Zhang, and T. Fear, “Biomarker of myocardial infarction: past, present and future,” *Univ. West. Ont. Med. J.* **81**, 23-24 (2012).
 12. J. Humlicek, “Polarized Light and Ellipsometry,” in *Handbook of Ellipsometry*, H. G. Tompkins and E. A. Irene ed. (William Andrew, Norwich, New York, NW, USA, 2005).
 13. H. Fujiwara, *Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications* (John Wiley & Sons, Chichester, England, 2007), Chapter 4 and Chapter 5.