

논문 98-7-4-05

살모넬라와 면역글로블린(hIgG)의 항원-항체반응 감지를 위한 표면 플라즈몬 공명형 센서시스템의 특성

엄년식*, 고광락**, 함성호**, 김재호***, 이승하****, 강신원**

Characteristics of Constructed SPR (Surface Plasmon Resonance) Sensor System for the Detection of Salmonella and hIgG Antigen-Antibody Reaction.

N. S. Um*, K. N. Koh**, S. H. Hahm**, J. H. Kim***, S. H. Lee****, and S. W. Kang**

요 약

본 연구에서는 특정한 생물학적 의미를 갖는 물질들간의 결합 및 분리과정을 실시간에 측정하기 위해 빠른 응답특성과 높은 감도를 갖는 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR) 현상을 이용한 센서 시스템을 제작하였다. SPR 시스템의 프리즘 표면에 일정 두께의 금 박막이 진공증착된 센서칩을 두고 이 아래에 위치한 시료층전셀에 살모넬라(salmonella) 항체를 주입시켜 항체가 센서칩 표면에 자기집합(self-assembly) 함에 따라 공명각이 변화하는 현상을 측정하였다. 이후 분석대상물질인 살모넬라 항원을 주입하여 항체와의 결합 상태를 일정 시간 간격을 두고 공명각의 변화로서 측정하고 이 결과를 분석하였다. 또한 human Immunoglobulin G(hIgG)를 항원으로 한 항원-항체 반응 역시 살모넬라의 경우와 같은 방법으로 측정하였다. 그 결과 살모넬라의 항체는 센서칩 표면에 약 10분 동안 자기집합하고 반응이 포화됨을 공명각의 변화를 통해 볼 수 있었으며, hIgG의 항체의 경우는 약 60분 동안 반응을 하고 포화됨을, 그리고 살모넬라와 hIgG의 항원(분석대상물질)은 모두 각각의 항체에 대해서 약 1분 이내에 결합하고 포화됨을 볼 수 있었다.

abstract

Surface Plasmon Resonance (SPR) sensor system, has rapid response and high sensitivity, can be applicable for detecting reaction times of many biospecific interactions. A SPR sensor system was constructed to detect the antigen-antibody reactions of salmonella and hIgG (human immunoglobulin G). Sensor chips made of gold thin film were used for detecting biological bindings of antigen and antibody reactions. The antigen and antibody reactions for salmonella and hIgG were carried out with various time intervals to observed characteristics of these reactions using SPR sensor system. The resonance angle shift changes were clearly observed at the time of salmonella or hIgG antibody injection into sample cell since each antibody was self-assembled on gold chip surface of the sensor. It was found that the antibodies of salmonella and hIgG reacted with its sensor chip surface in 10 minutes and 60 minutes respectively. And the antigens of both salmonella and hIgG were bound to its antibody within 1 minute.

* 경북대 대학원 센서공학과(Dept. of Sensor Eng., Graduate School, Kyungpook National Univ.)

** 경북대 센서기술연구소(Sensor Technology Research Center, Kyungpook National Univ.)

*** 아주대 공업화학(Devison of Chemical Eng. and Biotechnology, Ajou Univ.)

**** 경북대 전자전기공학부(School of Electronics and Electrical Eng., Kyungpook National Univ.)

<접수일자 : 1998년 5월 25일>

1. 서 론

기초과학 및 의료기기산업 분야에서 고감도, 고속도 계측에 대한 필요성에 따라 빠른 응답특성과 높은 정밀도 등의 장점을 갖는 광센서 기술 개발은 광산업 중에서도 중요한 분야 중의 하나가 되고 있다. 이러한

목적의 광센서 기술 중에서도 특히 SPR (Surface Plasmon Resonance) 관련 연구가 근래에 활발히 진행되고 있으며, 이 현상을 이용한 센서들은 주로 저농도의 용액 감지^[1-2], 가스 감지^[3-5] 및 생체 물질 감지^[6-8]를 위한 연구분야에서 특히 주목을 받고 있다. SPR형 바이오센서는 입사된 레이저 광에 의해 여기된 플라즈몬파와 소산파 (evanescent wave) 가 임의의 각에서 공명되어 반사도가 급격히 감소되는 현상 (공명각) 을 이용하므로 감지부에서 발생하는 생체 물질간의 결합 및 분리 과정을 실시간에 직접 관측할 수 있는 특징을 가진다. 또한, 이 공명각은 센서칩 표면의 질량 변화 등에 따른 유전율 변화에만 기인되므로, pM (picomol) 수준의 저농도 시료까지도 감지할 수 있는 높은 감도를 가진다. 이러한 특징을 가지는 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용한 센서 시스템으로는 회절 격자를 이용한 방법^[4]과 광도파로를 이용한 방법^[9], 프리즘을 이용한 방법^[10]이 있으며, 프리즘을 이용한 방법은 회절격자 방법이나 도파로 방법에 비해 구조가 간단하여 센서시스템화가 쉽고 효율이 좋은 장점을 가진다.

따라서 본 실험에서는 프리즘 방법의 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용한 센서 시스템을 구성하고, 금박막을 커버글라스에 진공증착한 센서칩을 제작하였다. 이 시스템을 사용하여 사람이나 동물에게 장티프스성 질환을 일으키고 또 식중독의 원인균이 되는 살모넬라를 측정하기 위하여 살모넬라에 대한 항체를 먼저 센서칩에 고정화시키고 살모넬라 자신이 갖고 있는 항원성분을 차례로 시료충전셀에 주입하여 시간간격을 두고 그 결합 정도를 살펴보고자 하였다. 그리고 hIgG 항체와 항원에 대해서도 같은 방법으로 그 공명 특성을 측정하고자 하였다.

II. 실험

1. 센서 시스템 구성

본 SPR 센서의 시스템은 그림 1과 같은 구조로 구축되었다. 광원은 3 mW의 레이저 다이오드 ($\lambda = 670$ nm, IMATRONIC Inc.) 를 사용하였고, 이 레이저 다이오드의 구동에 필요한 DC 5 V의 구동 전압과 60 mA의 드레인 전류는 전원공급기 (E3616A, HEWLETT PACKARD) 를 사용하여 공급해 주었다. 그리고 입사광에 의해 여기되는 플라즈몬은 전장성분만을 가지므로, 표면 플라즈몬파와 소산파의 공명 조건

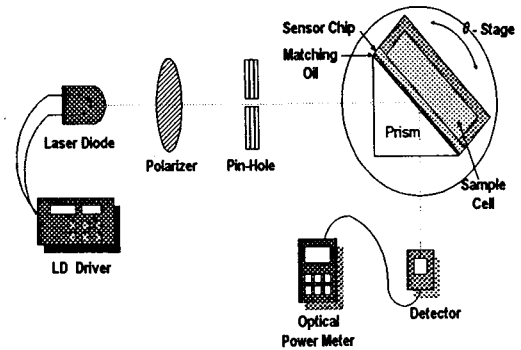


그림 1. 표면 플라즈몬 공명 센서 시스템의 계략도
Fig. 1. Schematic diagram of the SPR sensor system.

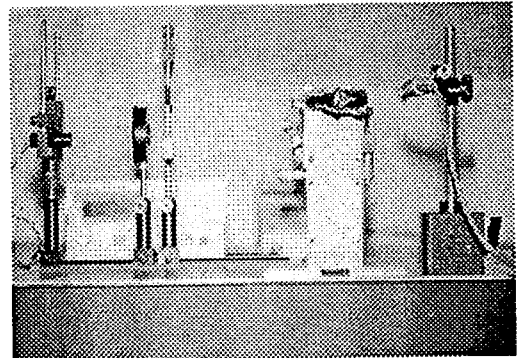


그림 2. 표면 플라즈몬 공명 센서 시스템 사진.
Fig. 2. Photography of SPR sensor system.

을 만들어 주기 위해 P 편광기 (SURUGA SEIKI CO.) 를 사용하여 입사광을 TM (Transverse Magnetic) 편광 시켰다. 편광된 입사광은 편홀을 통과해 직각 프리즘 ($n = 1.515$, SIGMA, BK7) 에 입사되고, 프리즘의 아래에는 센서칩이 놓여진다. 이 과정에서 프리즘과 센서칩 사이는 공기 층에 의한 굴절률 차가 생기므로 이멀전오일 ($n = 1.515 \sim 1.517$, MERCK) 을 프리즘과 센서칩 사이에 주입하여 굴절률 차를 없앨 수 있었다. 그리고, 센서칩 아래에는 테프론으로 제작된 560 μl 의 내부 체적을 갖는 시료충전셀을 두었으며, optical jig를 제작하여 프리즘과 시료충전셀 사이를 가압하였다. 그리고 감지부는 X-Y- θ 스테이지 (SURUGA SEIKI CO.) 위에 고정되고 이 스테이지를 사용해 프리즘에 입사각의 변화를 주며, 입사각의 변화에 따른 반사광의 강도 변화는 광검출기 (ADVANTEST,

TQ8210) 를 이용하여 측정하였다. 그리고 광원부와 감지부는 optical rail (NEWPORT) 상에 정렬하여 센서 시스템을 구성하였다.

2. 센서칩 제조

Kretschmann법^[11]에서 사용한 직각 프리즘의 빛변에 금속을 증착시켜 플라즈몬을 여기 시키는 경우는, 프리즘 구조상 금속을 증착하기가 어려울 뿐만 아니라 측정 후 프리즘에 증착된 금속을 식각하여야 하므로 프리즘에 손상이 생길 수 있으며 여러 가지 면에서 매우 비효율적이다. 따라서 본 실험에서는 프리즘 (n = 1.515) 과 굴절률 차가 거의 없는 얇은 커버글라스 (n = 1.522, 18 × 18 mm², t = 0.13 mm, MATSUNAMI) 를 기판으로 사용하여, 이 기판 위에 플라즈몬 여기가 쉽고 화학적으로 안정한 금속인 금을 진공증착법 (NRC 3115, Varian) 으로 증착하여 센서칩을 제작함으로써 간단하고 경제적으로 사용할 수 있게 하였다. 그리고, 금의 진공증착 시 발생하는 커버글라스와 금 사이의

접착력 문제는 0.001 g의 니켈-크롬을 증착함으로써 해결하였다. 이렇게 제작된 센서칩의 진공증착 조건은 표 1과 같고, 제작된 센서칩의 모형은 그림 3과 같다.

3. 측정

3.1 금박막의 두께 및 공명 특성 측정

제작된 센서칩의 금박막 두께는 커버글라스 위에 증착된 금박막의 일부를 사진석판법과 금 식각제 (KI 4 g + I₂ 1 g in 40 ml H₂O) 를 이용한 습식 식각법으로 금박막의 일부를 계단 모양으로 만든 후 Alpha-Step (Model 500 : TENCOR INSTRUMENTS) 을 사용하여 측정하였다. 그리고, 이 센서칩을 두께 별로 각각 프리즘 아래에 밀착시켜 금박막의 두께 변화에 따른 공명각 변화를 측정하였고, 이 중 반사율이 효율적으로 감소하는 최적 공명 특성을 나타내는 센서칩을 선택하였다. 또한 금박막 표면의 특성과 조성비를 조사하기 위해 AFM (Atomic Force Microscope) 과 AES (Auger Electron Microscopy) 를 이용해 분석하였다.

3.2 살모넬라 항체 · 항원과 hIgG 항체 · 항원의 측정

최적조건으로 제작된 센서칩을 이용하여, pH 7.6 Tris HCl Buffer 용액과 직접 제조후 정제한 4.3 µg/ml의 살모넬라 항체, 6.3 µg/ml의 살모넬라 항원 용액을 시료충전셀에 주입하여 일정한 시간동안 공명각의 변화를 측정하였다. 이때 금박막 표면에 비정상적으로 다량 결합한 항체를 제거시키기 위해서 카세인을 주입하여 표면처리를 하고 buffer 용액으로 세척 한 후 항원에 대한 공명각 변화를 측정하였다. 그리고 hIgG의 경우 10 µg/ml의 hIgG 항체, 6 µg/ml의 hIgG 항원 용액을 이용하여 살모넬라와 같은 방법으로 측정하였다.

표 1. 금 박막의 기본적인 진공증착 조건.

Table 1. The general evaporating condition for the making of gold thin layer.

Deposition parameter	
Vacuum	5 × 10 ⁻⁷ torr
Sample to source distance	33 cm
Boat	tungsten (t=0.2)
Ni-Cr	0.001 g
Au	0.19 g (99.7%)

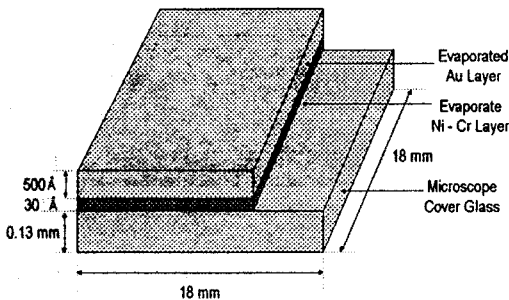


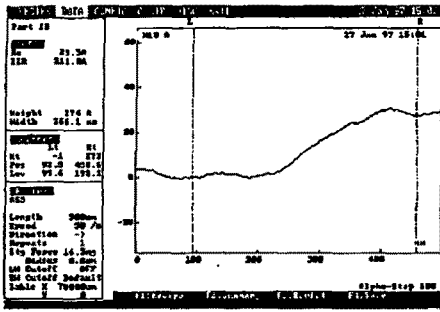
그림 3. 제조된 센서칩의 모식도.

Fig. 3. Schematic diagram of the sensor chip.

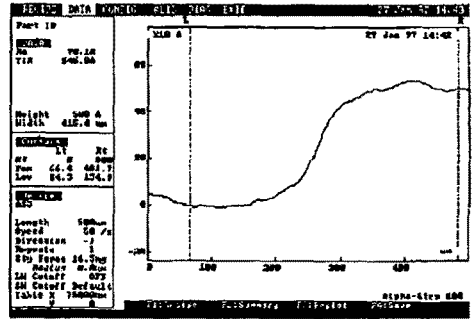
III. 결과 및 고찰

1. 금박막의 기본 특성 측정 및 두께 변화에 따른 공명 특성

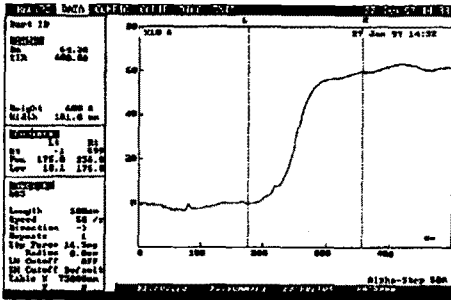
금박막의 두께 변화에 따른 플라즈몬 공명 특성을 알아보기 위해 일정한 진공증착 조건하에서 금의 양을 표 2와 같이 가감하여 4 종류로 제작된 금박막의 두께



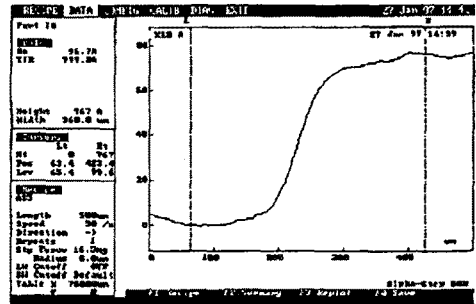
(a) 311 Å



(b) 545 Å



(c) 600 Å



(d) 777 Å

그림 4. 금박막의 두께 측정 결과.

Fig. 4. Thickness measurement results of the vacuum evaporated gold films.

를 Alpha-Step을 이용해 측정한 결과, 그림 4와 같이 각각 두께가 311 Å, 545 Å, 600 Å, 777 Å임을 알 수 있었다.

표 2. 진공 증착된 금의 양에 따른 금박막 두께.
Table 2. Thickness of the gold films according to various amount of evaporated gold quantity.

	Gold (g)	Evaporated Thickness (Å)
Type (a)	0.1425	311 Å
Type (b)	0.19	545 Å
Type (c)	0.2375	600 Å
Type (d)	0.285	777 Å
Amount	0.855	2233 Å

이 센서칩을 사용해 금박막의 두께별 플라즈몬 공명 특성을 측정된 결과 그림 5와 같이 545 Å의 두께 보다 두꺼운 센서칩일수록 공명각에서 반사도의 감소량이 증가하여 공명특성이 나빠짐을 알 수 있고, 545 Å 보다 얇은 311 Å에서는 545 Å에 비해 공명점에서 곡선이 비교적 넓게 분포해 정확한 공명점을 알 수 없다. 따라서, 표면 플라즈몬 공명 현상을 관찰하기 위한 금박막의 최적 두께는 545 Å이며, 이 때의 공명각은 43.75°임을 알 수 있다. 이 결과는 최적 두께에 대한 공명각의 이론치로서 두께가 521 Å일 때 44.17°라고 잘 알려진 공명특성과 매우 근사한 값이다^[12].

또한, 최적두께로 제작된 센서칩을 AFM과 AES를 사용해 금박막의 표면과 조성을 각기 분석하였다. 그 결과, 그림 6의 금박막 AFM 이미지에서 보여지듯이 임의의 1.00 μm² 면적을 측정된 결과 막표면의 평균 거칠기가 약 3 Å으로 매우 균일함을 알 수 있었고,

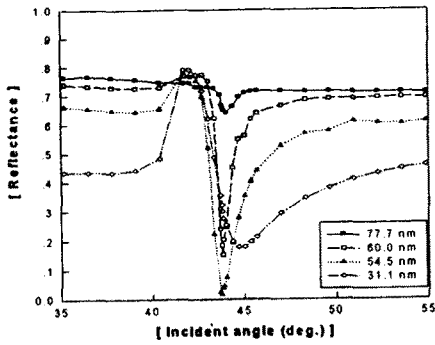


그림 5. 금박막 두께 변화에 따른 공명 특성.
Fig. 5. Resonance properties according to the gold film thickness.

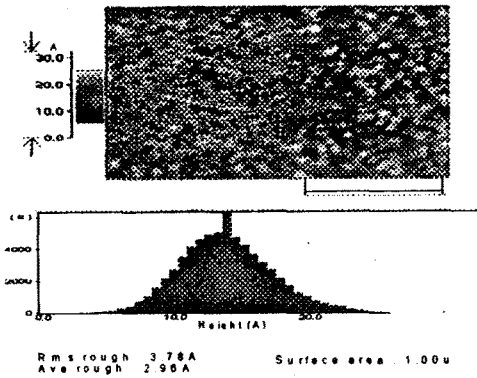


그림 6. 금박막의 표면 AFM 사진.
Fig. 6. AFM surface image of the gold thin film.

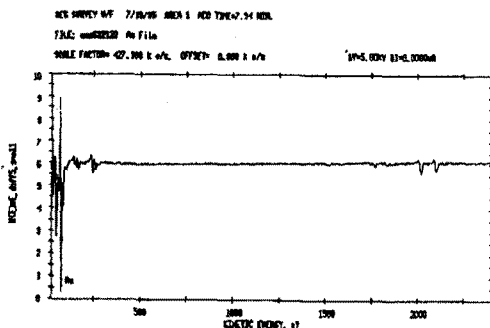


그림 7. 금박막 표면 성분 분석.
Fig. 7. Surface analysis of the gold film composition by AES.

AES 측정을 통해 센서칩 제조 시 있을 수 있는 오염 즉, 진공 증착 시 챔버환경에 의한 오염이 거의 없는 고 순도의 센서칩이 제조되었음을 알 수 있었다 (그림 7).

2. 살모넬라 항체·항원 및 hIgG 항체·항원의 공명 특성

진공 증착된 금박막을 센서칩으로 사용하여 살모넬라의 항체와 항원을 차례로 시료충전셀에 주입하여 금박막에 살모넬라의 항체를 자기집합 (self-assembly) 시킨 후 공명각의 변화를 측정하고, 시료충전셀에 살모넬라의 항원을 다시 주입하여 항체와의 결합 정도를 시간 간격에 따라 살펴보았다. 그 결과 먼저 살모넬라의 항체가 금 표면에 자기집합됨으로써 공명각이 약 0.42° 변하고, 그후 여분의 항체를 씻어내기 위한 카세인 처리 후에는 0.08° 변화하였다. 또한 마지막으로 살모넬라 항원 주입후의 항원-항체 반응에 의해서는 0.33° 변화됨을 확인할 수 있었고 항원은 1분내의 빠른 시간 안에 항체와 결합하고 반응정도가 포화됨을 볼 수 있었다 (그림 8, 9).

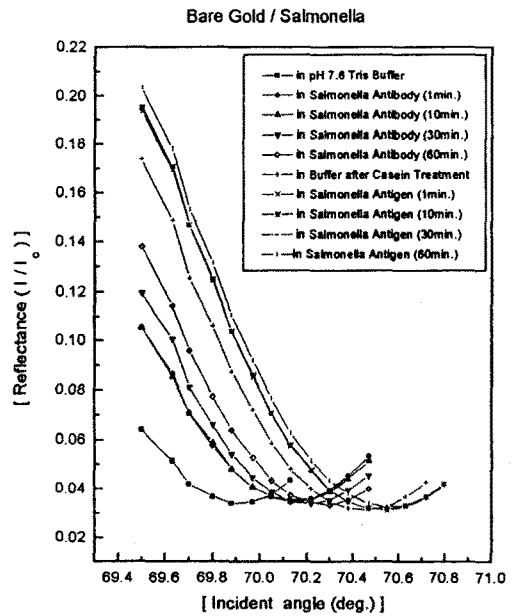


그림 8. 살모넬라 항체와 항원의 결합에 따른 공명특성.
Fig. 8. Resonance properties of salmonella antibody-antigen reaction.

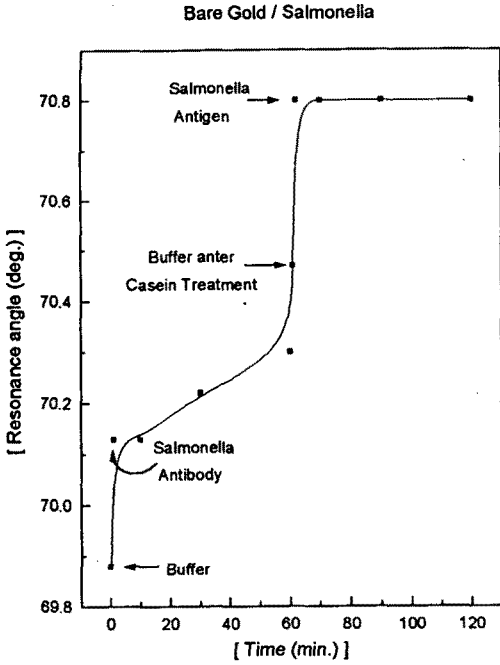


그림 9. 살모넬라 항체와 항원의 결합에 따른 공명각 변화량 및 시간추이.
Fig. 9. Time dependence of resonance angle shifts by salmonella antibody-antigen reaction.

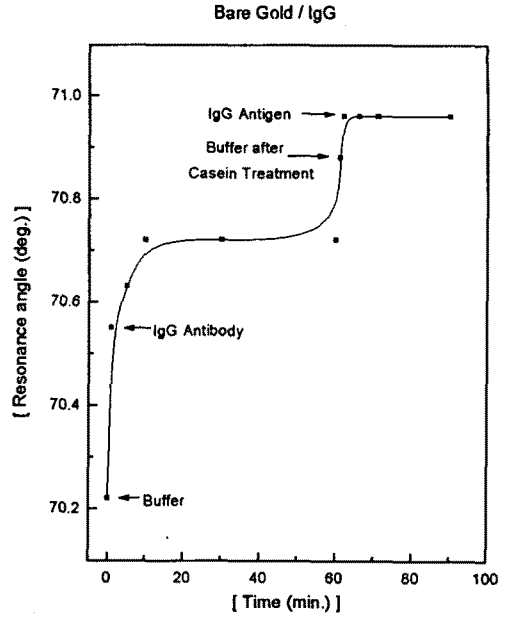


그림 11. hIgG 항체와 항원의 결합에 따른 공명각 변화량 및 시간추이.
Fig. 11. Time dependence of Resonance angle shifts by hIgG antibody-antigen reaction.

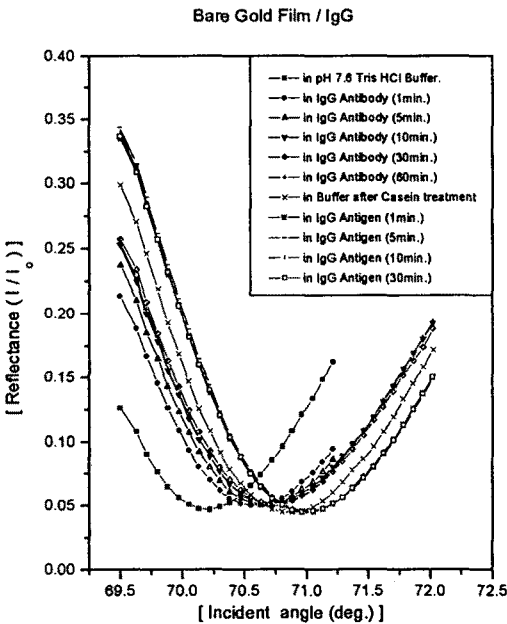


그림 10. hIgG 항체와 항원의 결합에 따른 공명특성.
Fig. 10. Resonance properties of hIgG antibody-antigen reaction.

위와 같은 방법으로 hIgG의 항체와 항원의 경우를 측정 한 결과, 그림10과 그림11에서 나타난 것처럼 hIgG 항체가 금 표면에 자기 집합됨으로써 공명각이 약 0.5° 변하고, 카제인 처리 후 0.16° 그리고 살모넬라의 항원이 항체에 결합되어 0.12°의 변화가 생기며 역시 약 1분 후 포화가 됨을 알 수 있었다. 이 두 결과로부터 살모넬라와 hIgG의 항체는 금 표면과 약 1분 동안에 걸쳐서 급격한 반응을 하여 자기 집합되고 그 후 60분 정도에 걸쳐서 서서히 결합이 완결되어 감을 알 수 있었으며, 항원 또한 약 1분 정도에서 급격한 항원-항체 반응을 통해 포화됨을 볼 수 있었다.

IV. 결 론

본 연구에서는 생물학적 물질들의 특성분석 및 결합 정도를 감지하기 위해 금속표면에 생체 물질의 결합 정도에 따라 유전율이 변하는 현상을 감지원리로 하는 SPR형 바이오센서의 시스템 및 센서칩 제작에 그 목적을 두었다. 따라서 먼저, 표면 플라즈몬 공명 센서

의 시스템을 소형·경량화 하여 구축하였으며, 진공증착법을 이용하여 센서칩을 제작하였다. 특히, 센서칩 제작 시 금 박막의 특성은 표면 플라즈몬 공명 현상에 매우 큰 영향을 미치므로, 센서칩 제조를 위한 금박막의 최적 증착 조건을 조사하기 위해 Alpha - Step과 AFM 및 AES를 통해 막 두께, 표면, 조성비를 조사하였다. 그 결과 금박막의 최적 두께는 545 Å이며, 이 박막의 표면 평균 거칠기는 3 Å으로 매우 균일하였고, 조성비 또한 매우 높은 순도를 유지함을 알 수 있었다. 또한 제작된 시스템을 이용하여 살모넬라와 hIgG의 항원·항체를 시료로 하여 각각의 항원·항체 반응에 따른 공명각 변화량 및 시간 추이를 검증한 결과 빠르고 효율적인 감응성이 있음을 확인하였다.

본 센서 시스템의 연구는 특정 생화학적 물질의 정밀한 감지가 가능함을 보여주는 것이며, 다양한 분야에서 실시간 측정이 용이한 바이오센서 시스템의 구축에 응용될 수 있으리라 사려된다.

참 고 문 헌

- [1] K. Ideta and T. Arakawa, "Surface plasmon resonance study for the detection of some chemical species", *Sensors and Actuators B*, vol. 13, pp. 384~386, 1993.
- [2] J. Melendez, R. Carr, D. U. Bartholomew, K. Kukanskis, and J. Elkind, "A commercial solution for surface plasmon sensing", *Sensors and Actuators B*, vol. 35, pp. 212~216, 1996.
- [3] S. J. Peacock, V. Rivalle and J. D. Wright, *SENSORS*, VI, Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia, pp. 15~20, 1993.
- [4] M. J. Jory, P. S. Vukusic and J. R. Sambles, "Development of a prototype gas sensor using surface plasmon resonance on gratings", *Sensors and Actuators B*, vol. 17, pp. 203~209, 1994.
- [5] B. Liedberg, C. Nylander, and N. Lundstrom, "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing", *Sensors and Actuators*, vol. 4, pp. 299~304, 1983.
- [6] B. Liedberg and I. Lundstrom, "Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance", *Sensors and Actuators B*, vol. 11, pp. 63~72, 1993.
- [7] W. Kukosz, "Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 6, pp. 215~225, 1991.
- [8] M. C. Millot, F. Martin, D. Bousquet, B. Sebillé, and Y. Levy "A reactive macromolecular matrix for protein immobilization on a gold surface. Application in surface plasmon resonance", *Sensors and Actuators B*, vol. 29, pp. 268~273, 1995.
- [9] R. D. Harris and J. S. Wilkinson, "Waveguide surface plasmon resonance sensors" *Sensors and Actuators B*, vol. 29, pp. 261~267, 1995.
- [10] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundstrom, "Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started" *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 10, pp. i-iv, 1995.
- [11] E. Kretschmann, "Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen", *Z. Physik*, vol. 241, pp. 313~324, 1971.
- [12] 황보 창권, 최철재, 최동철, "표면 플라즈몬 공명 측정에 의한 금속 박막의 광학 상수와 두께 결정", *The Journal of Optical Society of Korea*, vol. 2, pp. 59~65, 1991.

 著 者 紹 介

**엄년식**

1996년 경일대학교 기계공학과 졸업 (공학사), 1998년 경북대학교 대학원·센서공학과 졸업 (공학석사), 1998년 현재 동대학원 박사과정. 주관심 분야 : 광센서 및 센서 시스템 설계.

고 광 락

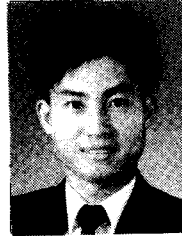
『센서학회지 제6권 제3호』 논문 97-6-3-07 p.220 참조.
현재 경북대학교 센서기술연구소 조교수.

함 성 호

『센서학회지 제5권 제5호』 논문 96-5-5-03 p.29 참조.
현재 경북대학교 센서기술연구소 전임강사.

**김 재 호**

1958년 3월 3일생. 1982년 아주대학교 졸업 (공학사), 1989년 미국 Univ. of Nebraska-Lincoln (Ph. D.), 1989년~1992년 미국 Ames Lab-USDOE 선임연구원, 1993년 Univ. of Neb. Bcitech Center 교원연구원, 1994년~현재 아주대학교 공업화학부 부교수.

**이 승 하**

1966년 7월 30일생. 1988년 경북대학교 전자공학과 졸업 (공학사), 1990년 한국과학기술원 전기 및 전자공학과 졸업 (공학석사), 1995년 한국과학기술원 전기 및 전자공학과 졸업 (공학박사), 1996년~

현재 경북대 전자·전기공학부 조교수.

강 신 원

『센서학회지 제4권 제1호』 논문 95-4-1-05 p.34 참조.
현재 경북대학교 센서기술연구소 조교수.