



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0116073  
(43) 공개일자 2009년11월11일

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01) G01N 21/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0041764

(22) 출원일자 2008년05월06일

심사청구일자 2008년05월06일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기  
획팀

(72) 발명자

손홍래

광주 서구 풍암동 중흥아파트3차 301동 1902호

장승현

광주광역시 북구 오치동 1028-5번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동준

전체 청구항 수 : 총 18 항

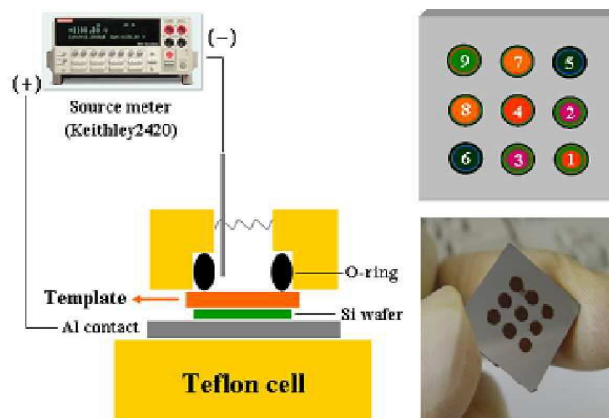
(54) 다공성 실리콘을 이용한 면역단백질 탐지용 바이오센서 및그의 제조방법

### (57) 요약

본 발명은 다공성 실리콘을 이용한 면역단백질 탐지용 바이오센서 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 면역단백질 탐지용 바이오센서는 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화하고 그 표면에 아민 유도체를 유도한 후, 상기 아민 유도체 말단에 바이오펜질을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시켜 제조된 다공성 실리콘에, 광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사를 이용하여 구현되는 것이다. 본 발명의 면역단백질 탐지용 바이오센서는 다공성 실리콘을 표면 안정화하는 동시에 면역단백질 탐지에 적합하도록 2~50nm 크기를 가지는 메조포러스의 다공성 실리콘을 이용함으로써, 면역성 질환, 만성 감염증, 흡수장애 증후군의 원인이 되는 항체 IgG, 프로테인-A, 아비딘 및 스트렙토아비딘 탐지에 유용하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**고영대**

광주광역시 동구 계림2동 518-62번지

**박재현**

광주광역시 광산구 산월동 부영아파트 307동 1204호

---

**양진석**

광주광역시 서구 양3동 초원파크 301호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

전기화학적 식각방법으로 제조된 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화하고 그 표면에 아민 유도체를 유도한 후, 상기 아민 유도체 말단에 바이오펜질을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시킨 다공성 실리콘에,

광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사를 이용하여 면역단백질을 탐지하는 것을 특징으로 하는 면역 단백질 탐지용 바이오센서.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다공성 실리콘이 정전류를 이용하여 전기화학적으로 비대칭 식각되어 제조된 다층 다공성 실리콘인 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다공성 실리콘이 사인(sine)파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어 제조된 다층 다공성 실리콘인 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 다공성 실리콘이 중심전류 값을  $150 \sim 250 \text{ mA/cm}^2$ 로 하고,  $1 \sim 200$  초 주기로 하는 사인파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어,  $400 \sim 2000\text{nm}$ 에서 단일 반사 피크(Rugate Single Peak)를 가지는 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서.

### 청구항 5

제3항에 있어서, 상기 다공성 실리콘이 중심전류 값을  $120 \sim 200 \text{ mA/cm}^2$ 로 하고, 2 내지 30개의 사인파형의 혼합된 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어,  $400 \sim 2000\text{nm}$ 에서 2 내지 30개의 다중 반사 피크(Rugate Multiple Peak)를 가지는 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다공성 실리콘이  $2 \sim 50\text{nm}$  크기의 메조포러스 기공을 가지는 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 감지인식체가 바이오틴, 그의 유도체 또는 바이오틴으로 유도화된 단백질 A에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 면역단백질이 아비딘, 스트렙토아비딘, 항체 IgG 및 단백질-A로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서.

### 청구항 9

- 1) 전기화학적 식각방법으로 다공성 실리콘을 제조하고,
- 2) 상기 다공성 실리콘을  $300 \sim 1200^\circ\text{C}$  온도조건에서  $1 \sim 60$ 분 동안 수행하여 상기 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화하고,
- 3) 상기 산화된 다공성 실리콘 표면에 아민 유도체를 유도 반응한 후, 상기 아민 유도체의 말단에 바이오펜질을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시켜 다공성 실리콘을 제조하고,
- 4) 상기 다공성 실리콘에 광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사를 이용한 것을 특징으로 하는 면역 단백질 탐지용 바이오센서의 제조방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단계 1)의 다공성 실리콘이 2~50nm 크기를 갖는 메조포러스의 다공성 실리콘으로 제조된 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 상기 단계 1)의 다공성 실리콘이 정전류를 이용하여 전기화학적으로 비대칭 식각되어 단층 다공성 실리콘으로 제조된 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

#### 청구항 12

제9항에 있어서, 상기 단계 1)의 다공성 실리콘이 사인(sine)파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어 다층 다공성 실리콘으로 제조된 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 단계 1)의 다공성 실리콘이 중심전류 값을 150~250 mA/cm<sup>2</sup>로 하고, 1~200 초 주기로 하는 사인파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어, 400~2000nm에서 단일 반사 피크(Rugate Single Peak)를 가지는 다공성 실리콘으로 제조된 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

#### 청구항 14

제12항에 있어서, 상기 단계 1)의 다공성 실리콘이 중심전류 값을 120~200 mA/cm<sup>2</sup>로 하고, 2 내지 30개의 사인파형의 혼합된 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어, 400~2000nm에서 2 내지 30개의 다중 반사 피크(Rugate Multiple Peak)를 가지는 다공성 실리콘으로 제조된 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

#### 청구항 15

제9항에 있어서, 상기 단계 2)에서 열적 산화된 다공성 실리콘의 표면이 Si-OH형으로 산화된 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

#### 청구항 16

제9항에 있어서, 상기 감지인식체가 바이오틴, 그의 유도체 또는 바이오틴으로 유도화된 단백질 A에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

#### 청구항 17

제9항에 있어서, 상기 면역단백질이 아비딘, 스트렙토아비딘, 항체 IgG 및 단백질-A로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

#### 청구항 18

제9항에 있어서, 상기 광원이 텅스텐-할로겐램프, LED(Light Emitting Diode) 또는 레이저에서 선택되는 것을 특징으로 하는 상기 바이오센서의 제조방법.

### 명세서

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술 분야

<1> 본 발명은 다공성 실리콘을 이용한 면역단백질 탐지용 바이오센서 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘의 표면을 안정화하는 동시에 면역단백질 탐지에 적합하도록 2~50nm 크기의 메조포러스 기공을 가지는 다공성 실리콘을 이용함으로써, 면역단백질 탐지에 유효한 바이오센서 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

##### 배경 기술

<2> 최근, 여러 가지 분석물을 탐지할 수 있는 센서로서 다공성 실리콘(Porous silicon, PSi)이 각광받고 있다. 이러한 다공성 실리콘은 반도체 재료인 실리콘웨이퍼를 전기화학적 부식을 통하여 실리콘웨이퍼 표면에 나노 크

기의 기공과 나노 입자를 갖는 단층 및 다층구조로 얻을 수 있다.

- <3> 상기 다공성 실리콘은 높은 표면적(수백  $\text{m}^2/\text{cm}^2$ )을 가지며, 광 발광성 또는 광학적 반사의 두 가지의 독특한 광학적 특성을 지니는데, 다공성 실리콘의 높은 표면적은 상대적으로 좁은 지점에 분석물질이 큰 농도가 될 수 있도록 해주며 인식현상에서 정량적 신호로 바꿀 수 있게 해준다.
- <4> 그러나, 다공성 실리콘의 독특한 광학적 특성에도 불구하고, 전기화학적 방법으로 제조된 다공성 실리콘은 Si-H의 표면을 가지고 있어 공기 중이나 수용액상에서 불안정하여, 후속 응용공정에 제한을 받아왔다.
- <5> 따라서 다공성 실리콘 중, 광학적 반사 특성을 이용하여 센서에 적용한 일에는 거의 보고된 바 없으며, 특히 다공성 실리콘을 이용하여 면역단백질 탐지용 바이오센서로 적용된 일례는 아직까지 보고된 바 없다.
- <6> 이에, 본 발명자들은 다공성 실리콘의 종래 문제점을 해소하고, 신규한 센서용도로 개발하고자 노력한 결과, 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화하여 표면을 안정화시킨 동시에 면역단백질 탐지에 적합하도록 상기 표면에 아민 유도체를 유도한 후, 상기 아민 유도체 말단에 바이오펜을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시킨 다공성 실리콘을 구현하고, 상기 다공성 실리콘에 광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사를 이용하여 면역단백질 탐지용 바이오센서로서의 탐지효율을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명의 목적은 전기화학적으로 식각된 특성의 다공성 실리콘을 이용한 면역단백질 탐지에 유효한 바이오센서를 제공하는 것이다.
- <8> 본 발명의 다른 목적은 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘의 표면을 안정화시키고 면역단백질 탐지에 적합하도록 제작된 다공성 실리콘을 이용한 면역단백질 탐지용 바이오센서의 제조방법을 제공하는 것이다.

### 과제 해결수단

- <9> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전기화학적 식각방법으로 제조된 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화하고 그 표면에 아민 유도체를 유도한 후, 상기 아민 유도체 말단에 바이오펜을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시켜 제조된 다공성 실리콘에, 광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사를 이용한 면역단백질 탐지용 바이오센서를 제공한다.
- <10> 본 발명의 면역단백질 탐지용 바이오센서는 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘의 표면을 안정화시키고 면역단백질 탐지에 적합하도록 제작된 다공성 실리콘을 이용한 것을 특징으로 한다.
- <11> 이에, 본 발명의 제1태양의 바이오센서에 사용되는 다공성 실리콘은 정전류를 흘려 전기화학적으로 비대칭 식각된 단층 다공성 실리콘을 사용하는 것이다.
- <12> 또한, 본 발명의 제2태양의 바이오센서에 사용되는 다공성 실리콘은 사인(sine)파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각된 다층 다공성 실리콘을 사용하는 것으로서, 중심전류 값을  $150 \sim 250 \text{ mA}/\text{cm}^2$ 로 하고,  $1 \sim 200$  초 주기로 하는 사인파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어,  $400 \sim 2000\text{nm}$ 에서 루게이트 단일 반사 피크(Rugate Single Peak)를 가지는 것이다.
- <13> 본 발명의 제3태양의 바이오센서에 사용되는 다공성 실리콘은 중심전류 값을  $120 \sim 200 \text{ mA}/\text{cm}^2$ 로 하고, 2 내지 30개의 사인파형의 혼합된 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어,  $400 \sim 2000\text{nm}$ 에서 2 내지 30개의 루게이트 다중 반사 피크(Rugate Multiple Peak)를 가지는 다공성 실리콘을 사용한다.
- <14> 본 발명의 제1태양 내지 제3태양에서 사용되는 다공성 실리콘은  $2 \sim 50\text{nm}$ 의 메조포러스 기공 크기를 가진다.
- <15> 본 발명의 바이오센서에서 감지인식체로는 바이오틴, 그의 유도체 또는 바이오틴으로 유도화된 단백질 A에서 선택되는 어느 하나를 사용하며, 본 발명의 바이오센서는 아비딘, 스트렙토아비딘, 항체 IgG 및 단백질-A로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 면역단백질을 탐지하는데 유용하다.
- <16> 본 발명은 면역단백질 탐지용 바이오센서의 제조방법을 제공한다. 더욱 상세하게는, 1) 전기화학적 식각방법으로 다공성 실리콘을 제조하고, 2) 상기 다공성 실리콘을  $300 \sim 1200^\circ\text{C}$  온도조건에서  $1 \sim 60$ 분 동안 수행하여 상기 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화하고, 3) 상기 산화된 다공성 실리콘 표면에 아민 유도체를 유도 반응한 후, 상기 아민 유도체의 말단에 바이오펜을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시켜 다공성 실리콘을 제조하고, 4)

상기 다공성 실리콘에 광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사를 이용한 것으로 이루어진다.

- <17> 이때, 단계 1)에서 제조된 다공성 실리콘은 2~50nm 크기를 갖는 메조포러스의 다공성 실리콘으로 제조된다.
- <18> 본 발명에서 사용되는 다공성 실리콘은 정전류를 이용하여 전기화학적으로 비대칭 식각되어 제조되는 단층 다공성 실리콘 및 사인(sine)파 전류를 이용하여 제조되는 다층 다공성 실리콘을 포함한다.
- <19> 본 발명에서 사용되는 바람직한 다층 다공성 실리콘으로는 중심전류 값을 150~250 mA/cm<sup>2</sup>로 하고, 1~200 초 주기로 하는 사인파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어, 400~2000nm에서 단일 반사 피크(Rugate Single Peak)를 가지는 루게이트 다공성 실리콘 또는 중심전류 값을 120~200 mA/cm<sup>2</sup>로 하고, 2 내지 30개의 사인파형의 혼합된 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어, 400~2000nm에서 2 내지 30개의 다중 반사 피크(Rugate Multiple Peak)를 가지는 루게이트 다층 다공성 실리콘을 포함한다.
- <20> 본 발명의 면역단백질 탐지용 바이오센서의 제조방법은 전기화학적 식각과정에서 Si-H의 표면을 가지는 다공성 실리콘 표면이 공기 중이나 수용액상에서 불안정한 문제점을 열적 산화하고, 그 표면에 아민 유도체를 유도한 후, 상기 아민 유도체 말단에 바이오물질을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시킨 다공성 실리콘을 제조하는 것을 특징으로 한다.
- <21> 이때, 감지인식체로는 바이오틴, 그의 유도체 또는 바이오틴으로 유도화된 단백질 A에서 선택되는 어느 하나를 사용하고, 이를 이용하여, 아비딘, 스트렙토아비딘, 항체 IgG 및 단백질-A로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 면역단백질을 탐지할 수 있다.
- <22> 본 발명의 바이오센서의 제조방법에서 사용되는 광원은 텅스텐-할로겐램프, LED(Light Emitting Diode) 또는 레이저에서 선택되는 것이다.

## 효 과

- <23> 본 발명에 따라 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘은 Si-H의 표면을 가지고 있어 공기 중이나 수용액상에서 불안정한 문제점을 열적 산화하고 그 표면에 아민 유도체를 유도함으로써 해결하여, 다공성 실리콘의 표면 안정화를 구현하였다.
- <24> 또한, 본 발명의 바이오센서는 표면이 안정화된 동시에 면역단백질 탐지에 적합하도록 2~50nm 크기를 가지는 메조포러스의 다공성 실리콘을 이용함으로써, 면역성 질환, 만성 감염증, 흡수장애 증후군의 원인이 되는 항체 IgG, 단백질-A, 아비딘 및 스트렙토아비딘 탐지에 유용하게 활용할 수 있다. 특히, 바이오틴으로 유도화된 다공성 실리콘을 이용하여, 바이오틴-면역단백질간의 결합으로 인한 항원항체 면역시스템에 활용할 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <25> 이하, 본 발명을 상세히 설명하고자 한다.
- <26> 본 발명은 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘 표면을 안정화시키고, 메조포러스의 기공을 가지는 다공성 실리콘을 이용한 면역단백질 탐지용 바이오센서를 제공한다.
- <27> 더욱 상세하게는, 본 발명의 면역단백질 탐지용 바이오센서는 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화하고 그 표면에 아민 유도체를 유도한 후, 상기 아민 유도체 말단에 바이오물질을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시켜 제조된 다공성 실리콘을 이용한 것이다.
- <28> 본 발명의 바이오센서에서 면역단백질의 탐지 방법으로는 본 발명의 다공성 실리콘 표면에 400~2000nm 파장을 갖는 광원을 입사하고, 상기 입사한 빛의 광학적 반사를 통하여 반사스펙트럼의 단파장 또는 장파장 이동을 통하여 탐지한다. 반사스펙트럼의 이동은 브래그 식에 따라 다공성 실리콘 기공 내의 굴절률의 변화에 의해서 반사 파장의 이동이 이루어진다.
- <29> 이에, 본 발명의 바이오센서는 메조포러스의 기공을 가지는 다공성 실리콘의 표면을 기능·유도체화하여 면역단백질과의 선택성을 증가시켜 감도 및 탐지속도를 향상함으로써, 탐지효율을 증가시킨다.
- <30> 본 발명의 면역단백질 탐지용 바이오센서에 사용되는 다공성 실리콘의 기공 모양, 크기 및 방향은 표면의 저항과 결정 실리콘의 불순물 정도 및 흘려주는 전류, 온도, 식각 시 사용하는 HF 용액의 농도에 따라 달라진다. 이때, 본 발명에서 사용되는 다공성 실리콘은 2~50nm 크기의 메조포러스 기공을 가지는 것이 바람직하다. 이때, 상기 기공크기가 2nm 미만의 마이크로포러스와, 50nm를 초과하는 마크로포러스 기공을 가지면, 56×50×40

Å의 크기를 갖는 아비딘 또는  $54 \times 58 \times 48 \text{ Å}$  크기의 스트렙토아비딘 탐지에 활용할 수 없다.

<31> 1. 제1태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서

<32> 본 발명의 제1태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서는 정전류를 이용하여 전기화학적 비대칭 식각방법으로 제조되며,  $400 \sim 2000 \text{ nm}$ 에서 프린지(fringe) 피크 패턴을 가지는 단층 다공성 실리콘을 이용하고, 상기 단층 다공성 실리콘에, 광원을 입사하고, 상기 입사한 빛의 광학적 반사를 이용하여 면역단백질을 탐지한다.

<33> 더욱 상세하게는 식각면적의 지름을  $2 \text{ mm}$ 정도로 작게 한 식각 모형 틀을 이용하여 비대칭 식각하면, 각각 식각된 영역이 2차원으로 서로 다른 반사피크를 가지는 다공성 실리콘(on-chip multi-encoded porous silicon)을 제작할 수 있다[도 1]. 이때, 다공성 실리콘의 표면 관찰결과, 전극 위치와 가까운 첫 번째 자리(1)는 많은 전류의 영향을 받아 다공성도가 크고, 멀어질수록 다공성도가 작아지는 광학 인코딩된 단층 다공성 실리콘을 얻을 수 있다[도 2].

<34> 본 발명에서 사용되는 단층 다공성 실리콘의 광학적 특성은 광원을 입사하면, 하기 수학적 식 1로 표시되는 브래그(Bragg) 식에 따라 거동하는 프린지 피크 패턴(주름 패턴)의 반사스펙트럼을 얻을 수 있다.

수학적 식 1

<35> 
$$m\lambda = 2nL \cdot \sin\theta$$

<36> (상기에서, m는 광학계수이고,  $\lambda$ 는 파장이고, n은 굴절률이고, L은 필름 두께이다.)

<37> 이때,  $\theta$ 가  $90^\circ$  이므로  $\sin\theta$ 는 1이다. 따라서, 반사파장은 굴절률(n)과 필름 두께(L)에 의해서 달라진다. 또한, 다공성 실리콘이 센서로서 작용할 때 두께 L은 고정되므로, 반사파장은 굴절률(n)에 의해서 결정된다.

<38> 즉, 실험적으로 굴절률(n)과 필름 두께(L)을 구하면, 다층다공성 실리콘의 광학두께를 알 수 있으며, 바이오물질의 결합으로 인해 전체 다공성 실리콘의 굴절률이 변함에 따라 탐지할 수 있다. 또한, 광학유효두께(EOT: effective optical thickness)를 측정할 수 있었다.

<39> 광학두께에 대하여,  $nL = m\lambda / 2$ 로 표기하면, 보강간섭으로 인해 m번째 증폭하는 반사피크의 파장을 반으로 나눈 값이 광학두께이므로, 이를 프로그래밍하면, 광학유효두께(EOT: effective optical thickness)를 측정할 수 있다[도 3].

<40> 또한, 본 발명의 제1태양의 바이오센서에 대하여, 바이오물질로서 스트렙토아비딘, 항체 IgG 및 프로테인-A를 탐지한 후, 유효광학두께 변화를 관찰한 결과, 바이오센서와 바이오물질간의 결합으로 굴절률(n)이 증가하므로, 유효광학두께가 증가함을 확인할 수 있다[도 5].

<41> 도 6a 및 도 6b는 본 발명의 광학 인코딩된 단층 다공성 실리콘을 이용한 제1태양의 바이오센서의 형태를 나타낸 것이다. 따라서, 본 발명의 제1태양의 바이오센서는 각각 식각된 영역에 다양한 항체와 결합할 수 있는 항원을 연결하면, 선택적이고 간편한 바이오센서로 활용될 수 있다.

<42> 2. 제2태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서

<43> 본 발명의 제2태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서는 사인(sine)파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각된 다층 다공성 실리콘을 이용하는 것으로서,

<44> 하기 수학적 식 2에 의해 합성할 수 있다.

수학적 식 2

<45> 
$$Y = A \times \sin(kt) + B$$

<46> (상기에서, A는 진폭, k는 진동수(Hz), t는 시간, B는 파형의 중앙값이 된다.)

<47> 더욱 상세하게는 제2태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서에 사용되는 다공성 실리콘은 중심전류 값을  $150 \sim 250 \text{ mA/cm}^2$ 로 하고,  $1 \sim 200$  초 주기로 하는 사인파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어,  $400 \sim 2000 \text{ nm}$ 에서 단일 반사 피크(Rugate Single Peak)를 가지는 루게이트 다공성 실리콘[도 7]이다. 나아가, 상기 루게이트 다공성 실리콘에 광원을 입사하고, 상기 입사한 빛의 광학적 반사를 이용하여 탐지하는 것이다.

<48> 본 발명의 제2태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서에 사용되는 루게이트 다공성 실리콘은 반측 띠폭값(full-

width at half-maximum, FWHM)이 15nm이고, 629 nm에서 매우 높고 매우 얇은 광 반사 스펙트럼을 보인다. 또한, 루게이트 다공성 실리콘의 표면에 대한 SEM 측정결과, 2~50nm, 더욱 바람직하게는 10nm 크기의 메조포러스 기공을 확인할 수 있다[도 8].

<49> 본 발명의 제2태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서에 바이오물질로서 아비딘을 흘려주었을 때 광 반사 스펙트럼의 변화를 관찰한 결과, 반사 스펙트럼에서 반사파장이 18nm로 장파장 이동을 확인함으로써 면역단백질을 탐지한다[도 9].

<50> 3. 제3태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서

<51> 본 발명의 제3태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서는 중심전류 값을 120~200 mA/cm<sup>2</sup>로 하고, 2 내지 30개의 사인파형의 혼합된 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각되어, 400~2000nm에서 2 내지 30개의 다중 반사 피크(Rugate Multiple Peak)를 가지는 루게이트 다공성 실리콘을 이용한다[도 10].

<52> 본 발명의 제3태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서에 사용되는 다층 다공성 실리콘은 식각 시, 사인(sine)파 전류를 이용하여 전기화학적으로 식각된 다층 다공성 실리콘을 이용하는 것으로서, 하기 수학적 식 3에 의해 합성할 수 있다.

### 수학적 식 3

$$Y = A \cdot \sin(f \times t) + A_{center}$$

<53> (상기에서, A는 진폭, f는 진동수(Hz), t는 시간, A<sub>center</sub>는 파형의 중앙값이다.)

<55> 사인(sine)파의 파형과 식각조건을 조절하여 루게이트 구조를 갖는 다공성 실리콘을 제작할 수 있는데 루게이트 다공성 실리콘의 장점은 사인(sine)파를 이용하여 파형에 대한 푸리에 변환하면 다공성 실리콘에서 반사되어 나오는 빛의 상쇄와 보강간섭으로 인한 반사피크를 미리 예측할 수 있다. 더 나아가, 여러 개의 반사피크들이 원하는 파장들에서 상대적인 세기를 조절할 수 있도록 광학 인코딩(optical encoding)할 수 있다. 또한, 제3태양의 바이오센서에 사용되는 루게이트 다층 다공성 실리콘 표면에 대한 SEM 측정결과, 2~50nm, 더욱 바람직하게는 15nm 크기의 메조포러스 기공을 확인할 수 있다[도 11].

<56> 본 발명의 제3태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서에 바이오물질로서 아비딘 및 스트렙토아비딘을 흘려주었을 때 광 반사 스펙트럼의 변화를 관찰한 결과, 아비딘은 반사피크 각각이 9, 10, 11nm 장파장 이동하고, 스트렙토아비딘은 12, 13, 15nm 장파장 이동을 확인함으로써 면역단백질을 탐지한다[도 12].

<57> 본 발명의 제3태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서는 다중 반사피크를 가지는 루게이트 다층 다공성 실리콘을 광학 인코딩(multiplex assay)함으로써, 여러 가지 분석물질들을 단시간에 감지할 수 있다.

<58> 본 발명은 면역단백질 탐지용 바이오센서의 제조방법을 제공한다. 더욱 상세하게는, 본 발명의 바이오센서의 제조방법이

<59> 1) 전기화학적 식각방법으로 다공성 실리콘을 제조하고,

<60> 2) 상기 다공성 실리콘을 300~1200℃ 온도조건에서 1~60분 동안 수행하여 상기 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화하고,

<61> 3) 상기 산화된 다공성 실리콘 표면에 아민 유도체를 유도 반응한 후, 상기 아민 유도체의 말단에 바이오물질을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시켜 다공성 실리콘을 제조하고,

<62> 4) 상기 다공성 실리콘에 광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사를 이용하여 면역단백질을 탐지하는 것이다.

<63> 본 발명의 단계 1)에서 제조된 다공성 실리콘은 정전류를 이용하여 전기화학적으로 비대칭 식각되어 제조되는 단층 다공성 실리콘 및 사인(sine)파 전류를 이용하여 제조되는 다층 다공성 실리콘을 포함한다. 또한, 상기 다층 다공성 실리콘이 400~2000nm에서 단일 반사 피크(Rugate Single Peak)를 가지는 루게이트 다공성 실리콘 및 400~2000nm에서 2 내지 30개, 더욱 바람직하게는 2개 내지 15개의 다중 반사 피크(Rugate Multiple Peak)를 가지는 루게이트 다층 다공성 실리콘을 포함한다.

<64> 본 발명의 제1태양 내지 제3태양의 면역단백질 탐지용 바이오센서에서 사용된 다공성 실리콘과 동일하게 사용하

므로, 다공성 실리콘에 대한 상세한 설명을 생략한다.

- <65> 본 발명의 제조방법에서 단계 2)는 단계 1)에서 전기화학적 식각과정에서 제조된 다공성 실리콘이 공기 중이나 수용액상에서 불안정한 Si-H의 표면을 가지므로, 상기 다공성 실리콘을 열적 산화하여 그 표면을 Si-OH형으로 산화하는 공정이다[도 4].
- <66> 이때, 열적 산화공정은 300~1200℃ 온도조건에서 1~60분 동안 수행하며, 더욱 바람직하게는 가열로(furnace)에서 수행하는 것이다. 가열온도가 300℃미만이면, 산화반응이 서서히 진행하여 바람직하지 않고, 1200℃를 초과하면 산화된 다공성 실리콘이 불안정하여 문제가 있다.
- <67> 본 발명의 제조방법에서 단계 3)은 단계 2)에서 다공성 실리콘 표면이 Si-H에서 Si-OH로 산화된 후, 그 표면에 아민 유도체를 유도 반응한다.
- <68> 이때, 아민 유도체는 생물물질을 감지하기 위한 관능기 링커(linker)로서 한쪽 끝이 알콕시 그룹을 가지고 있는 실란으로 이루어져 산화된 다공성 실리콘의 표면에 Si-OH와 반응할 수 있어야하며, 다른 끝에 아민그룹이 있는 화합물이라면, 특별히 제한되지 않고 사용할 수 있으나, 바람직한 일례로는 3-아미노프로필트리메톡시실란, 아미노알킬트리알콕시실란, 아미노알킬디알콕시실란, 및 아미노알킬알콕시실란으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이다.
- <69> 이후, 다공성 실리콘의 표면에 아민 유도체를 유도한 후, 상기 아민 유도체의 말단에 바이오물질을 인식할 수 있는 감지인식체를 고착시킨다.
- <70> 고착방법은 바이오틴 함유 화합물을 유기용매 하에 용해시켜 냉각하고, 필요에 따라 촉매를 첨가하여 교반한 용액에, 아민 유도체가 결합된 다공성 실리콘을 첨가하고 실온에서 반응시키는 것이다.
- <71> 감지인식체로는 바이오틴, 그의 유도체 또는 바이오틴으로 유도화된 단백질 A를 사용할 수 있으며, 이에 대한 감지대상물로서, 면역성 질환, 만성 감염증, 흡수장애 증후군의 원인이 되는 항체 IgG, 단백질-A, 아비딘 및 스트렙토아비딘 등의 면역단백질 탐지에 유용하다.
- <72> 본 발명의 제조방법에서 단계 4)은 상기 단계에서 표면 안정화되고 면역단백질 탐지에 적합하도록 메조포러스의 기공을 가진 다공성 실리콘에 광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사를 이용하여 면역단백질을 탐지하는 공정이다.
- <73> 본 발명에서 사용되는 광원은 400~2000nm 파장을 갖는 텅스텐-할로겐램프 또는 각각의 다층 다공성 실리콘으로부터 나오는 반사피크와 일치하는 파장을 갖는 LED(Light Emitting Diode) 또는 레이저(Laser)를 포함하는 백색 광원을 사용한다.
- <74> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다.
- <75> 본 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <76> <실시예 1> 다층 다공성 실리콘을 이용한 바이오센서 제작 1
- <77> 단계 1: 다층 다공성 실리콘의 제조
- <78> 순수한  $p^{++}$ -type의 실리콘 웨이퍼(B doped, <100>, 0.08~0.012 mΩ·cm)를 침형 백금전극을 이용하여 정전압기(Galvanostat, Keithley 2420)를 이용하여 비대칭으로 전류를 흘려주면서 전기화학적으로 식각하여, 다공성 실리콘(on-chip multi-encoded porous silicon)을 제조하였다. 일정한 패턴의 기공(pore)과 깊이(depth)를 갖는 다공성 실리콘을 합성하기 위한 식각 용매로서, 48중량% HF 수용액 및 에탄올이 3:1 v/v로 혼합하여 사용하였으며 전류 60 mA·mm<sup>-2</sup>를 20초 동안 흘려주었다. 이때, 상기 용매는 알드리치사 제품을 구입하여 사용하였다. 모든 공정은 테프론 셀에서 수행하고, 식각 후에는 에탄올과 아르곤 가스를 이용하여 세척 및 건조하였다.
- <79> 이때, 식각면적의 지름을 2mm 정도로 작게 한 식각 모형 틀을 이용하여 비대칭 식각하면, 백금전극이 놓인 위치로부터 x 만큼의 거리에 위치한 부분은 거리에 반비례하여 상대적으로 낮은 전류의 영향을 받아 비대칭으로 식각된 다공성 실리콘을 제작하였다[도 1].
- <80> 상기 제조된 다공성 실리콘의 표면에 대한 주사전자현미경(SEM) 측정 결과, 백금의 위치와 가까운 첫 번째 자리는 많은 전류의 영향을 받아 다공성도가 크고, 멀어질수록 다공성도가 작아지는 것을 확인하였다[도 2].

<81> 상기 제조된 단층 다공성 실리콘을 퓨리에 변환을 통하여 퓨리에 변환 스펙트럼을 얻은 결과, 프린지 패턴(주름 패턴)이 관찰되었다[도 3].

<82> 단계 2: 열적 산화

<83> 단계 1에서 식각과정을 통해 얻은 다공성 실리콘은 Si-H의 표면을 가지고 있어 공기 중이나 수용액상에서 불안정하므로, 전기로(Thermolyne F6270-26 furnace equipped with controller)를 사용하여 상기 다공성 실리콘을 300℃에서 1시간 동안 가열하였다.

<84> 단계 3: 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화

<85> 상기 단계 2에서 산화된 다공성 실리콘을 3-아미노프로필트리메톡시실란(10 mmol, 99%, 알드리치사 제품) 1ml를 넣고 80℃로 12시간동안 가열하고, 가열 후 에탄올, 디클로로메탄, 아세톤 순서로 세척한 다음 질소가스로 건조하여, 아민 그룹을 갖는 다공성 실리콘 표면을 제작하였다.

<86> 이후, 바이오물질을 인식할 수 있는 감지인식체로서, 바이오틴(biotin)을 표면에 고착화시키기 위하여, 바이오틴 테트라플로로페닐 에스테르 100mg를 N,N-디메틸포름아마이드 용매에 용해한 후, 촉매로서 트리에틸아민 0.9 ml를 넣고 30분간 높은 속도로 교반하였다. 상기 교반액에 상기에서 제조된 아민 그룹을 갖는 다공성 실리콘을 첨가하고 실온에서 12시간 동안 반응하였다. 반응종료 후, 에탄올, 디클로로메탄, 아세톤 순서로 세척한 다음 질소가스로 건조시켰다.

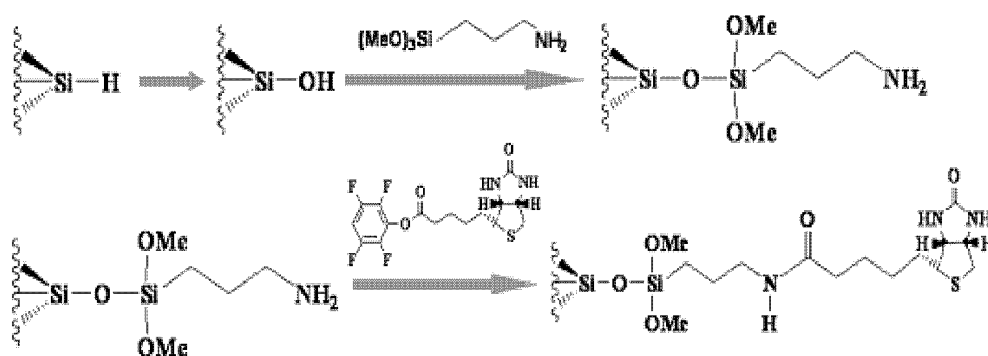
<87> 이때, 바이오틴 테트라플로로페닐 에스테르는 바이오틴 2.5g(10.22 mmol)을 70℃의 N,N-디메틸포름아마이드 200 ml에 아르곤 하에서 용해시킨 후 냉각하고, 테트라아민 2.5ml(20.5 mmol)를 주입한 후, 2,3,5,6-테트라플로로페닐 트리플로로아세테이트 4g(15.25 mmol)를 첨가하였다. 실온에서 30분간 반응시켜주며 용매는 진공상태에서 제거하였다. 이때, 생성물은 100ml의 에테르에 녹여 여과시켜 준비하였다.

<88> 단계 4: 바이오 물질의 탐지

<89> 상기 바이오틴으로 유도화된 다공성 실리콘 칩을 이용하여 바이오 물질들을 선택적으로 탐지하고 면역 화학 검사 시 면역성 질환, 만성 감염증, 흡수장애 증후군(Malabsorption Syndrome)의 원인이 되는 항체 IgG를 탐지하는 센서로서 활용하였다.

<90> 상기 바이오틴으로 유도화된 다공성 실리콘 칩을 플로우 셀(flow cell)에 고정시킨 상태에서 0.8ml/min의 유속으로 스트렙토아비딘(streptavidin), 바이오틴으로 유도화된 단백질 A 및 휴먼 IgG의 바이오 물질을 순차적으로 흘려 사용하였다.

<91> 반응식 1



<92>

<93> <실험예 1>

<94> 실시예 1에서 제조된 단층 다공성 실리콘을 이용한 바이오센서에 대하여, 성능분석을 하기와 같이 수행하였다.

<95> 1. FT-IR 스펙트럼 측정

<96> 상기 실시예 1에서 제조된 단층 다공성 실리콘 칩을 이용한 바이오센서에 대하여, 각 단계별로 산화 및 유도체화의 여부는 FT-IR을 통해 확인하였다.

<97> 그 결과를 도 4에 도시하였다.

도 4에서 (A)는 식각된 다공성 실리콘의 FT-IR 스펙트럼으로서, 2119와 914cm<sup>-1</sup>에서 Si-H의 신축 진동과 굽힘 진동을 확인하였다. (B) 상기 식각된 다공성 실리콘을 300℃의 전기로(furnace)에서 1시간 동안 가열한 열적 산화된 다공성 실리콘에 대한 FT-IR 스펙트럼으로서, Si-H의 신축 진동 영역인 2085~2150cm<sup>-1</sup>의 피크가 줄어들게 되고 OSi-H의 신축 진동과 굽힘 진동이 각각 2200~2250 과 877cm<sup>-1</sup>에서 나타나는 것을 확인하였다. 또한, Si-O-Si의 진동은 1000~1200cm<sup>-1</sup>에서 강하게 나타나는 결과를 확인함으로써, 다공성 실리콘의 산화여부를 확인하였다.

또한, (C)는 아민그룹으로 유도화된 다공성 실리콘의 표면을 FT-IR 스펙트럼 통해 확인된 결과로서, 아민결합의 3386cm<sup>-1</sup>에서 신축진동 및 1575cm<sup>-1</sup>에서 굽힘진동 피크를 확인하였으며, 체인형태의 C-H 신축진동은 2850, 2923, 2952cm<sup>-1</sup>에서 확인하였다.

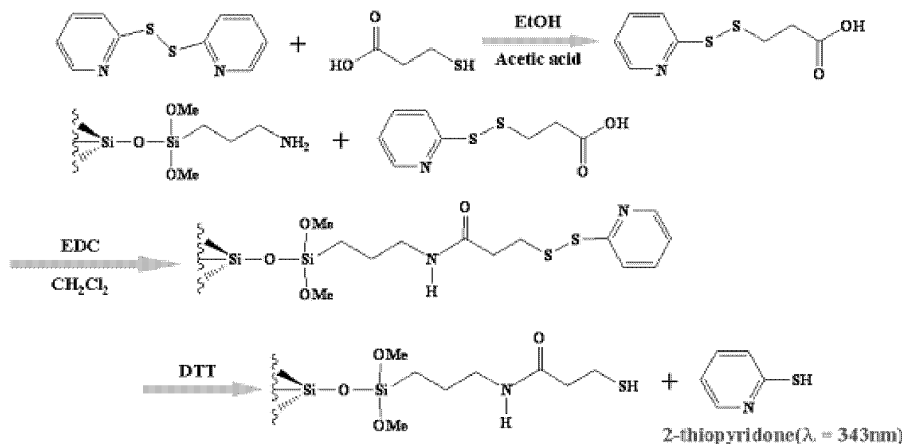
(D)는 바이오틴이 유도화된 다공성 실리콘의 FT-IR 스펙트럼 결과로서, 바이오틴의 머리에 해당하는 C-C 신축진동은 1652cm<sup>-1</sup>에서 확인함으로써, 반응된 바이오틴이 결합되었음을 확인하였다.

## 2. 표면 고정화 반응 검증

상기 실시예 1의 단계 3에서 제조된 아민 그룹의 표면 고정화 반응을 확인하기 위하여, 2-피리딜-2-카르복실에틸 디설피드를 표면에 결합시키고 디싸이오쓰레이톨(dithiothreitol, DTT)에 의해 떨어지는 2-싸이오피리돈(thiopyridone)의 양을 분석하였다.

더욱 상세하게는, 2-피리딜-2-카르복실에틸 디설피드 0.2g(94.7 mmol)를 디클로로메탄 10ml에 녹인 후, 1-(3-(디메틸아미노)프로필)-3-에틸카르보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC) 100mg(0.6mmol)를 첨가한 용매에 실시예 1의 단계 3에서 (3-아미노프로필)트리메톡시실란으로 유도화된 다공성 실리콘을 첨가하고 12시간동안 실온에서 반응시켰다. 이후, 디싸이오쓰레이톨(dithiothreitol, DTT)에 의해 방출되는 2-싸이오피리돈(thiopyridone)의 정량을 자외선 분광기( $\lambda_{\max}=343\text{nm}$ ,  $\epsilon = 8.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )를 통해 확인하였다[반응식 2]. 60 mA/mm<sup>2</sup> 전류에 의해 식각된 실리콘 칩의 경우 연결된 분자의 숫자는 대략 30~80%가 표면에 결합한다고 했을 때, 그 정량은 137nmol/mm<sup>2</sup>이다. 이를 계산해 보면, 구멍의 크기는 평균 25~90nm이고, 0.071cm<sup>2</sup>의 영역에 평균 0.03Å 간격으로 바이오틴 결합을 확인하였다.

반응식 2



## 3. 바이오 센서로서의 바이오 물질의 탐지

상기 실시예 1에서 제조된 바이오틴으로 유도화된 다공성 실리콘을 플로우 셀(flow cell)에 고정시키고 인산완충용액(PBS)을 흘려주며 최초의 반사파장을 측정하였다.

이후, 셀에 PBS에 스트렙토아비딘 20μM를 녹여 0.8 mL/min의 속도로 흘려주면서 반사스펙트럼을 관찰하였다. 그 결과, 도 5에서 보이는 바와 같이, 굴절율 n의 증가로 인해 유효광학두께가 증가하였다. 백금전극의 많은 영향으로 유효광학두께가 높은 첫 번째 자리부터 아홉 번째 자리까지 전체적으로 스트렙토아비딘과 자리 결합하여 각각 유효광학두께가 증가한 것을 확인하였다. 다음으로 스트렙토아비딘의 남은 자리결합을 하고 항원 역할

을 하는 바이오틴으로 유도화된 프로테인 A(biotinylated-protein A) 20  $\mu$ M를 녹인 PBS 용액을 동일속도로 셀에 흘려주었다.

<109> 도 3과 같이 스트렙토아비딘의 남은 자리와 바이오틴이 결합된 프로테인 A가 결합을 하여 굴절률 n의 증가로 인하여, 도 5에서 보이는 바와 같이, 유효광학두께의 변화를 확인하였다. 이때, 순수한 PBS를 흘려주어도 이미 결합을 한 결합은 변화를 보이지 않고 최종 유효광학두께를 유지한다. 이렇게 프로테인 A로 유도체화된 다공성 실리콘을 이용해 면역 화학 검사 시 면역성 질환, 만성 감염증, 흡수장애 증후군(Malabsorption Syndrome)의 원인이 되는 항체 Ig를 탐지하는 센서로서의 기능을 확인하였다.

<110> 역시 PBS 용매에 IgG 100  $\mu$ M를 녹여 0.8mL/min의 속도로 흘려준다. 항체인 IgG는 항원인 프로테인 A와 결합함으로써, 유효광학두께가 변화하였다[도 5].

<111> 따라서,  $2 \times 2 \text{cm}^2$ 에 지름이 2mm인 9개의 식각된 영역을 확대하여, 4인치에 보다 많은 식각 영역을 만들어 주어 미지의 특정한 물질을 선택적으로 한 번에 탐지해 내기 위한 바이어 센서 칩을 개발하였다.

<112> 또한, 도 6a 및 도 6b는 지름을 다르게 하여 합성한 비대칭 식각으로 광학 인코딩된 다공성 실리콘으로서, 각각의 영역들은 서로 다른 광학 신호를 가지고 있다. 도 6a는 지름을 6mm로 하고 4인치 크기에 51개의 영역을 식각한 형태이고, 도 6b는 지름을 2mm하여 294개의 영역을 식각한 형태이다. 이러한 바이오센서는 각각 식각된 영역에 다양한 항체와 결합할 수 있는 항원을 연결하여 준다면 선택적이고 간편한 바이오센서로 활용될 수 있다.

<113> 실시예 1에서 제작된 다공성 실리콘 바이오센서를 이용하여 바이오물질인 스트렙토아비딘과의 분자인식에 대하여 연구를 수행하였다. 연구방법은 바이오물질이 기질과 결합함으로써 발생하는 굴절률의 변화로 인해 반사파 크가 장파장으로 변위를 하게 된다. 이때, 감지 신호를 증폭하는 방법으로 장파장 변위를 광학두께의 변화로 변형하여 분석하였다.

#### <114> <실시예 2> 루게이트 다공성 실리콘을 이용한 바이오센서 제작

<115> 단계 1: 루게이트 다공성 실리콘의 제조

<116> 순수한 p-타입의 실리콘 단결정 웨이퍼(B doped,  $<100>$ ,  $0.08 \sim 0.012 \text{ m}\Omega \cdot \text{cm}$ )를  $1.5 \text{cm}^2$ 의 크기로 절단하고, 식각 전에 에탄올로 2~3회 씻은 후 아르곤 가스로 표면처리하였다. 상기 실리콘 웨이퍼를 고정시킨 후, 컴퓨터에 의해 조절 가능한 전류공급기(Keithley 2420)를 이용하고 식각 용매로서, 48중량%의 HF 수용액(알드리치사 제품) 및 무수 에탄올(알드리치사 제품)의 3:1 v/v로 배합용매를 이용하여, 사인파를 흘려주며 전기화학적 식각을 수행하였다. 이때, 사인파의 전류는  $150 \sim 250 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ,  $0.44 \text{ Hz}$ 를 이용하였으며, 다공성 실리콘의 식각 면적은  $1.0 \text{ cm}^2$ 으로 수행하였으며, 식각 후에는 에탄올과 아르곤 가스를 이용하여 세척 및 건조하여, 루게이트 다공성 실리콘을 제작하였다.

<117> 단계 2: 열적 산화

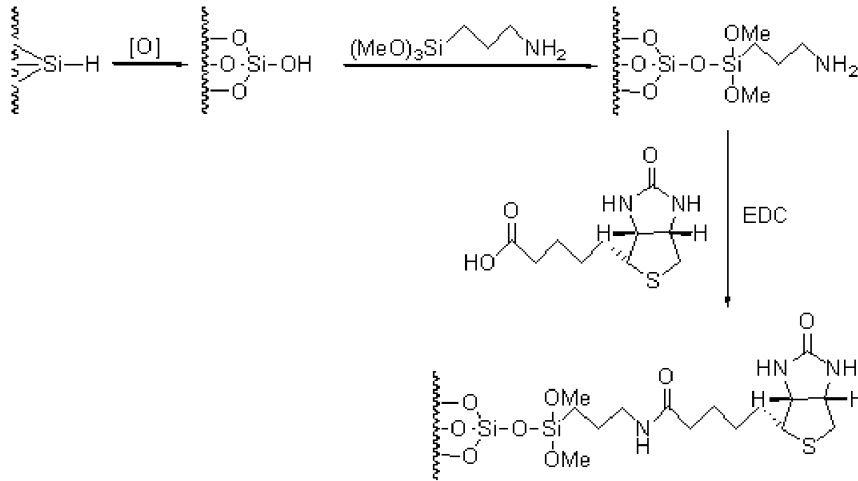
<118> 단계 1에서 얻은 루게이트 다공성 실리콘을 전기로(Thermolyne F6270-26 furnace equipped with controller)내  $300^\circ\text{C}$  온도에서 1시간 동안 가열하여 열적 산화 처리하였다.

<119> 단계 3: 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화

<120> 상기 단계 2에서 산화된 다공성 실리콘을 3-아미노프로필트리메톡시실란( $10 \text{ mmol}$ , 99%, 알드리치사 제품)  $1.8 \text{ mL}$ 를 넣고  $80^\circ\text{C}$ 로 19시간동안 가열하고, 가열 후 톨루엔, 아세톤, 에탄올 순서로 세척한 다음 질소가스로 건조하여, 아민 그룹을 갖는 다공성 실리콘 표면을 제작하였다.

<121> 이후, 바이오물질을 인식할 수 있는 감지인식체로서, 바이오틴(biotin)을 표면에 고착화시키기 위하여, 바이오틴  $100 \text{ mg}$ 을 디클로로메탄  $100 \text{ mL}$ 에 넣고 완전히 용해시킨 후, 1-(2-(디메틸아미노)프로필)-3-에틸카르보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC)  $200 \text{ mg}(1 \text{ mmol})$ 를 첨가하여 1시간동안 용해시켰다. 이후, 상기 열적 산화된 루게이트 다공성 실리콘을 첨가하여 밤새 반응하였다. 반응이 종결된 루게이트 다공성 실리콘 칩을 빼내어, 톨루엔, 디클로로메탄 및 인산완충용액(PBS,  $\text{pH} = 7.4$ )로 3회씩 세척하였다.

<122> 반응식 3



## <실험예 2>

실시예 2에서 제조된 루게이트 다공성 실리콘을 이용한 바이오센서에 대하여, 성능분석을 하기과 같이 수행하였다.

### 1. 광 반사 스펙트럼 측정

상기 실시예 2에서 제조된 루게이트 다공성 실리콘에 대하여, 광학 프로브가 장착된 광학간섭기(Ocean optics USB2000)을 이용하여 광 반사 스펙트럼을 측정하였다. 이때, 텅스텐 광원은 다공성 실리콘의 표면에 거의 1~2 mm 점으로 초점을 맞추었고, 스펙트라는 CCD 검출기를 통하여, 400~1200nm 파장영역을 기록하였다.

도 7은 실시예 2에서 제조된 루게이트 다공성 실리콘의 광 반사 스펙트럼으로서, 629 nm에서 매우 높고 매우 얇은 광 반사 스펙트럼을 보였으며, 루게이트 다공성 실리콘의 필름의 반축 띠폭값(full-width at half-maximum, FWHM)은 15nm로 관찰되었다. 이러한 결과는 양자점(quantum dot)이 갖는 20nm보다 더 얇은 값이며, 루게이트 다공성 실리콘의 대표적인 특징은 유기 염료나 코어-셸 양자점으로부터 발광하는 스펙트럼보다 더 얇다. 따라서, 더욱더 많은 얇은 스펙트라를 갖는 루게이트 다공성 실리콘을 제조할 수 있다.

### 2. FT-IR 스펙트럼 측정

상기 실시예 2에서 제조된 루게이트 다공성 실리콘의 각 단계별 반응을 FT-IR(Nicolet model 5700)을 통하여 확인하였다. FT-IR 스펙트라는 확산반사(Spectra-Tech diffuse reflectance attachment)방식을 이용하여 측정하였다[미도시].

그 결과, 300℃에서 열적 산화된 다공성 실리콘의 표면은 열적 산화이전의 Si-H의 신축 진동 영역인 2085~2150cm<sup>-1</sup>의 피크가 줄어들고, OSi-H의 신축 진동과 굽힘 진동이 각각 2200~2250 및 877cm<sup>-1</sup>에서 보이고, Si-O-Si의 진동은 1000~1200cm<sup>-1</sup>에서 강하게 나타남으로써, 다공성 실리콘의 표면이 Si-H에서 Si-OH로 산화되었음을 확인하였다.

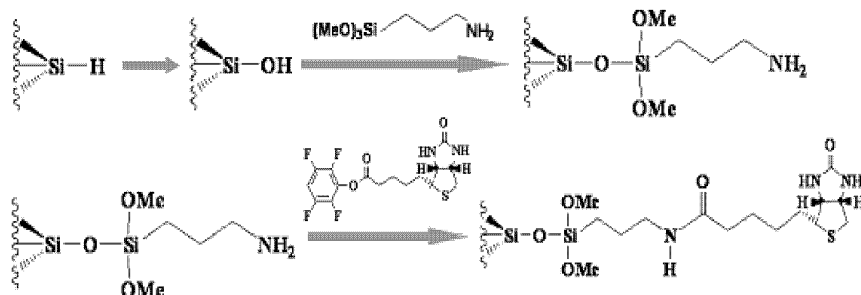
또한, 산화된 루게이트 다공성 실리콘의 흡광밴드는 산화된 루게이트 다공성 실리콘 샘플이 거의 0를 포함하고, H는 거의 없음을 뒷받침하였다. 이러한 결과는 산화가 되면서 순수한 루게이트 다공성 실리콘의 Si-H의 종류가 사라졌음을 의미한다. 또한, 광 반사 스펙트럼이 초기 629nm에서 556nm로 73nm정도 단파장 이동하였는데, 이러한 결과로부터, Si에서 SiO<sub>2</sub>로 변하면서 굴절률의 감소가 일어났음을 알 수 있다.

열적 산화 처리이후, 다공성 실리콘의 Si-OH 표면이 아민그룹으로 유도체화되면, 아민결합으로 인한 신축진동 3386cm<sup>-1</sup>에서 굽힘진동 1575cm<sup>-1</sup> 피크를 확인하였다. 또한, 체인형태의 C-H 신축진동은 2850, 2923, 2952cm<sup>-1</sup>에서 확인하였다.

이후, 바이오틴이 유도화된 다공성 실리콘의 FT-IR 스펙트럼 결과는 바이오틴의 머리에 해당하는 C-C 신축진동은 1652cm<sup>-1</sup>에서 확인함으로써, 반응된 바이오틴이 결합되었음을 확인하였다.

### 3. 표면 고정화 반응 검증

- <136> 상기 실시예 2의 단계 3에서 제조된 아민 그룹의 표면 고정화 반응을 확인하기 위하여, 2-피리딜-2-카르복실에틸 디설피드를 표면에 결합시키고 디싸이오쓰레이톨(dithiothreitol, DTT)에 의해 떨어지는 2-싸이오피리돈(thiopyridone)의 정량 분석하였다[미도시].
- <137> 방출되는 2-싸이오피리돈의 정량을 자외선 분광기(UV-2401 PC, Shimadzu,  $\lambda_{\max}=343\text{nm}$ ,  $\epsilon = 8.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 통해 확인하였다. 그 결과, 실시예 2에서  $150 \sim 250 \text{ mA}/\text{mm}^2$  전류에 의해 식각된 다공성 실리콘의 경우 연결된 분자의 숫자는 대략 30~80%가 표면에 결합한다고 했을 때, 그 정량은  $300\text{nmol}/\text{mm}^2$ 이다. 이를 계산해 보면, 구멍의 크기는 평균  $10\text{nm}$ 이고,  $1.2\text{cm}^2$ 의 영역에 평균  $0.03\text{\AA}^2$  간격으로 바이오틴 결합을 확인하였다.
- <138> 4. 루게이트 다공성 실리콘의 표면관찰
- <139> 상기 실시예 2에서 제조된 루게이트 다공성 실리콘의 표면을 주사전자현미경(SEM, FE-SEM, S-4700, Hitach)를 이용하여 측정하였다.
- <140> 도 8은 루게이트 다공성 실리콘의 표면에 대한 SEM 측정결과로서, 상기 루게이트 다공성 실리콘의 기공크기는  $10\text{nm}$ 이었으며, 이 기공을 이용하여  $56 \times 50 \times 40\text{\AA}$ 의 크기를 갖는 아비딘 탐지가 가능하다.
- <141> 5. 바이오 센서로서의 바이오 물질의 탐지
- <142> 상기 실시예 2에서 제조된 바이오틴으로 유도화된 루게이트 다공성 실리콘에 아비딘을 흘려주었을 때 광 반사 스펙트럼의 변화를 관찰하였다.
- <143> 도 9는 실시예 2에서 제조된 루게이트 다공성 실리콘을 이용한 바이오센서에 아비딘을 흘려주었을 때 광 반사 스펙트럼의 변화로서, 반사 스펙트럼에서 반사파장이  $18\text{nm}$ 으로 장파장 이동하였다. 이러한 결과는 바이오틴으로 유도화된 다공성 실리콘 필름에 아비딘과 결합하여 굴절률의 변화가 일어났기 때문이며, 이러한 증가는 수용액 상의 아비딘이 결합하였음을 의미한다.
- <144> **<실시예 3> 광학 인코딩된 루게이트 다공성 실리콘을 이용한 바이오센서 제작**
- <145> 단계 1: 광학 인코딩된 루게이트 다공성 실리콘의 제조
- <146> 순수한  $p^{++}$ -타입의 실리콘 웨이퍼(B doped,  $\langle 100 \rangle$ ,  $0.0008 \sim 0.0012 \text{ }\Omega$ )를 이용하고, 컴퓨터 프로그램(Matlab)을 사용하여 3가지 사인파형의 혼합된 전류 즉, 전류의 세기를  $126.1 \sim 183.85 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 에 0.58, 0.54, 0.50Hz의 혼성된 사인파형을 500초 동안 흘려주는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일하게 수행하여 일정한 패턴의 기공(pore)과 깊이(depth)를 갖는 광학 인코딩된 루게이트 다공성 실리콘을 제조하였다.
- <147> 단계 2: 열적 산화
- <148> 단계 1에서 식각된 루게이트 다공성 실리콘을 전기로(Thermolyne F6270-26 furnace equipped with controller)내  $300^\circ\text{C}$  온도에서 3시간 동안 가열하여 열적 산화 처리하였다.
- <149> 단계 3: 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화
- <150> 상기 단계 2에서 산화된 다공성 실리콘을 3-아미노프로필트리메톡시실란( $10 \text{ mmol}$ , 99%, 알드리치사 제품)  $1\text{ml}$ 를 넣고  $80^\circ\text{C}$ 로 12시간동안 가열하고, 가열 후 에탄올, 디클로로메탄, 아세톤 순서로 세척한 다음 질소가스로 건조하여, 아민 그룹을 갖는 다공성 실리콘 표면을 제작하였다.
- <151> 이후, 바이오물질을 인식할 수 있는 감지인식체로서, 바이오틴(biotin)을 표면에 고착화시키기 위하여, 바이오틴 테트라프로페닐 에스테르  $100\text{mg}$ 를 N,N-디메틸포름아마이드 용매에 용해한 후, 촉매로서 트리에틸아민  $0.9 \text{ ml}$ 를 넣고 30분간 높은 속도로 교반하였다. 상기 교반액에 상기에서 제조된 아민 그룹을 갖는 다공성 실리콘을 첨가하고 실온에서 12시간동안 반응하였다. 반응종료 후, 에탄올, 디클로로메탄, 아세톤 순서로 세척한 다음 질소가스로 건조시켰다.
- <152> 단계 4: 바이오 물질의 탐지
- <153> 상기 바이오틴으로 유도화된 다공성 실리콘 칩을 이용하여 바이오 물질들을 선택적으로 탐지하는 연구를 수행하고자, 상기 바이오틴으로 유도화된 다공성 실리콘 칩을 플로우 셀(flow cell)에 고정시킨 상태에서  $0.8\text{ml}/\text{min}$ 의 유속으로 스트렙토아비딘(streptavidin) 또는 아비딘을 탐지대상으로 설정하였다.



실시예 3에서 제조된 광학 인코딩된 루게이트 다공성 실리콘을 이용한 바이오센서에 대하여, 성능분석을 하기와 같이 수행하였다.

상기 실시예 3에서 제조된 광학 인코딩된 루게이트 다공성 실리콘을 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1 및 2와 동일한 방법으로 광 반사 스펙트럼을 측정하였다.

## 2. FT-IR 스펙트럼 측정

상기 실시예 3에서 제조된 광학 인코딩된 루게이트 다공성 실리콘을 이용한 것을 제외하고는, 상기 실험예 1 및 2와 동일한 방법으로 FT-IR(Nicolet model 5700) 스펙트라를 얻었다[미도시].

그 결과, 300℃에서 열적 산화된 다공성 실리콘의 표면은 Si-H의 신축 진동 영역인 2085~2150cm<sup>-1</sup>의 피크가 줄어들고, OSi-H의 신축 진동과 굽힘 진동이 각각 2200~2250 및 877cm<sup>-1</sup>에서 보이고, Si-O-Si의 진동이 1000~1200cm<sup>-1</sup>에서 강하게 나타남으로써, 다공성 실리콘의 표면이 Si-H에서 Si-OH로 산화되었음을 확인하였다.

또한, 산화된 루게이트 다공성 실리콘의 흡광밴드는 산화된 루게이트 다공성 실리콘 샘플이 거의 0를 포함하고, H는 거의 없음을 뒷받침하였다. 이러한 결과는 산화가 되면서 순수한 루게이트 다공성 실리콘의 Si-H의 종류가 사라졌음을 의미한다. 또한, 광 반사 스펙트럼이 초기 629nm에서 556nm로 73nm정도 단파장 이동하였는데, 이러한 결과로부터, Si에서 SiO<sub>2</sub>로 변하면서 굴절률의 감소가 일어났음을 알 수 있다. 또한, 산화된 다공성 실리콘은 굴절율(n)이 감소함에 따라, 그 유효광학두께도 변화하게 되는데 첫 번째 포지션을 기준으로 평균 31 nm 이동하였다.

열적 산화 처리이후, 다공성 실리콘의 Si-OH 표면이 아민그룹으로 유도체화되면, 아민결합으로 인한 신축진동  $3386\text{cm}^{-1}$ 에서 굽힘진동  $1575\text{cm}^{-1}$  피크를 및 체인형태의 C-H 신축진동은  $2850, 2923, 2952\text{cm}^{-1}$ 에서 확인함으로써, 아민그룹 유도체화 반응을 확인하였다.

또한, 바이오틴이 유도화된 다공성 실리콘의 FT-IR 스펙트럼 결과는 바이오틴의 머리에 해당하는 C-C 신축진동은  $1652\text{cm}^{-1}$ 에서 확인함으로써, 반응된 바이오틴이 결합되었음을 확인하였다.

### 3. 표면 고정화 반응 검증

상기 실시예 3에서 제조된 아민 그룹의 표면 고정화 반응을 확인하기 위하여, 2-피리딜-2-카르복실에틸 디설피드를 표면에 결합시키고 디싸이오쓰레이톨(dithiothreitol, DTT)에 의해 떨어지는 2-싸이오피리돈(thiopyridone)의 정량 분석하였다[미도시].

방출되는 2-싸이오피리돈의 정량을 자외선 분광기(UV-2401 PC, Shimadzu,  $\lambda_{\text{max}}=343\text{nm}$ ,  $\epsilon = 8.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )를 통해 확인하였다. 그 결과,  $126.1 \sim 183.85 \text{ mA/cm}^2$  전류에 의해 식각된 실시예 3의 다공성 실리콘의 경우, 연결

된 분자의 숫자는 대략 30~80%가 표면에 결합한다고 했을 때, 그 정량은  $300\text{nmol}/\text{cm}^2$ 이다. 이를 계산해 보면, 구멍의 크기는 평균 15nm이고, 다공성도는 81.7%, 식각된 층의 두께는  $68.4\ \mu\text{m}$ 이며  $1.2\text{cm}^2$ 의 영역에 평균  $0.07\ \text{\AA}^2$  간격으로 바이오틴 결합을 확인하였다.

#### 4. 루게이트 다공성 실리콘의 표면관찰

상기 실시예 3에서 제조된 루게이트 다공성 실리콘의 표면을 주사전자현미경(SEM, FE-SEM, S-4700, Hitach)를 이용하여 측정하였다.

도 11은 루게이트 다공성 실리콘의 표면에 대한 SEM 측정결과로서, 상기 루게이트 다공성 실리콘의 기공크기는 15nm이었다.

#### 5. 바이오 센서로서의 바이오 물질의 탐지

상기 실시예 3에서 제조된 바이오틴으로 유도화된 루게이트 다공성 실리콘에 스트렙토아비딘(streptavidin) 또는 아비딘을 흘려주었을 때 광 반사 스펙트럼의 변화를 관찰하였다.

도 12는 실시예 3에서 제조된 루게이트 다층 다공성 실리콘을 이용한 바이오 센서에 아비딘을 흘려주었을 때 광 반사 스펙트럼의 변화로서, 아비딘은 반사피크 각각이 9, 10, 11nm 장파장으로 이동하였고, 스트렙토아비딘은 12, 13, 15nm 장파장으로 이동하였다.

아비딘보다 스트렙토아비딘이 더 많은 이동 폭을 보였으며, 아비딘은  $56 \times 50 \times 40\ \text{\AA}$ 이고, 스트렙토아비딘은  $54 \times 58 \times 48\ \text{\AA}$ 의 크기를 가지고 있다. 따라서, 스트렙토아비딘이 아비딘보다 더 큰 분자크기를 가지고 있기 때문에, 굴절율에 미치는 영향이 커서 조금 더 장파장으로 이동한 것으로 예측할 수 있다.

또한 BET식을 이용하여 비표면적을 측정하였다. 산화된 다공성 실리콘의 비표면적은 표 1에 나타나 있다.

【표 1】

| 시료                 | BET                           |
|--------------------|-------------------------------|
| 열적 산화된 다공성 실리콘     | $3.1369\ \text{m}^2/\text{g}$ |
| 바이오틴 결합 다공성 실리콘    | $3.4477\ \text{m}^2/\text{g}$ |
| 스트렙토아비딘 결합 다공성 실리콘 | $3.5605\ \text{m}^2/\text{g}$ |

그 결과, 바이오틴으로 유도체화된 다공성 실리콘은 그 표면에 바이오틴으로 유도체화되어 비표면적의 길이가 증가하는 것을 확인할 수 있고, 바이오틴과 스트렙토아비딘이 결합하여 그 비표면적이 증가함을 확인하였다.

### 산업이용 가능성

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은

첫째, 전기화학적으로 식각된 다공성 실리콘의 표면을 안정화시키고 면역단백질 탐지에 적합하도록 제작된 다공성 실리콘을 이용한 면역단백질 탐지용 바이오 센서를 제공하였다.

둘째, 특정의 다공성 실리콘에 광원을 입사하고, 상기 입사한 광원의 광학적 반사 특성을 이용하여 탐지효율을 높인 바이오 센서를 제공하였다.

셋째, 특정의 단층 또는 다층 구조의 다공성 실리콘을 광학 인코딩함으로써, 여러 가지 분석물질들을 단시간에 감지할 수 있다.

넷째, 바이오틴으로 유도화된 다공성 실리콘을 이용함으로써, 바이오틴과 결합가능한 면역단백질, 아비딘, 스트렙토아비딘, 항체 IgG 및 단백질-A에 탐지가 가능한 항원항체 면역시스템에 활용할 수 있다.

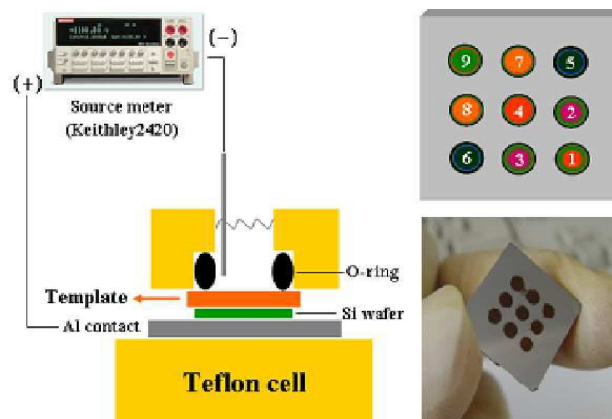
이상에서 본 발명은 기재된 구체예에 대해서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속함은 당연한 것이다.

### 도면의 간단한 설명

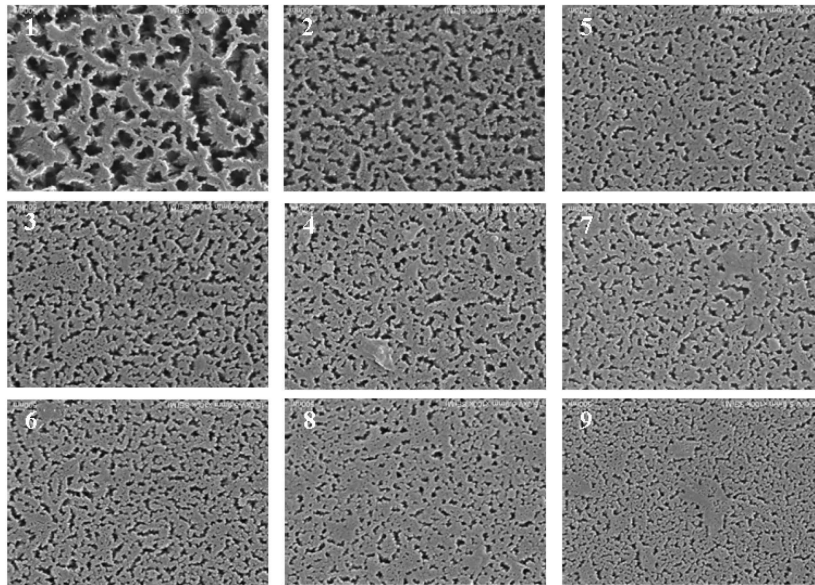
- <187> 도 1은 본 발명의 제1태양의 바이오센서로서, 전기화학적으로 비대칭 식각되어 제작된 단층 다공성 실리콘을 나타낸 것이다.
- <188> 도 2는 본 발명의 제1태양의 바이오센서에 사용된 단층 다공성 실리콘의 표면에 대한 SEM 측정결과이다.
- <189> 도 3은 본 발명의 제1태양의 바이오센서에 사용된 단층 다공성 실리콘의 퓨리에 변환을 통한 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- <190> 도 4는 본 발명의 제1태양의 바이오센서에 사용된 단층 다공성 실리콘을 이용한 바이오센서 제작시 각 단계별 적외선 분광스펙트럼을 나타낸 것이다.
- <191> 도 5는 본 발명의 제1태양의 바이오센서의 바이오 물질에 대한 유효광학두께 변화를 나타낸 것이다.
- <192> 도 6a 및 도 6b는 본 발명의 광학 인코딩된 단층 다공성 실리콘을 이용한 제1태양의 바이오센서의 형태를 나타낸 것이다.
- <193> 도 7은 본 발명의 제2태양의 바이오센서에 사용된 루게이트 다공성 실리콘의 광학 반사 스펙트럼이다.
- <194> 도 8은 본 발명의 제2태양의 바이오센서에 사용된 루게이트 다공성 실리콘 표면의 SEM 측정결과이다.
- <195> 도 9는 본 발명의 제2태양의 바이오센서의 바이오물질 탐지에 대한 반응전후의 광학 반사 스펙트럼이다.
- <196> 도 10은 본 발명의 제3태양의 바이오센서에 사용된 루게이트 다공성 실리콘의 광 반사 스펙트럼이다.
- <197> 도 11은 본 발명의 제3태양의 바이오센서에 사용된 루게이트 다공성 실리콘 표면의 SEM 측정결과이다.
- <198> 도 12는 본 발명의 제3태양의 바이오센서의 바이오물질 탐지에 대한 반응전후의 광학 반사 스펙트럼이다.

## 도면

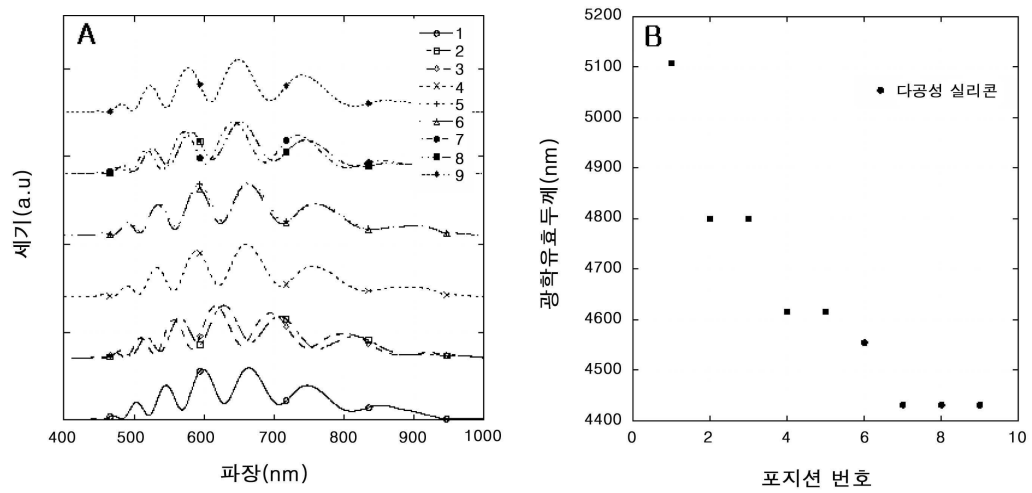
### 도면1



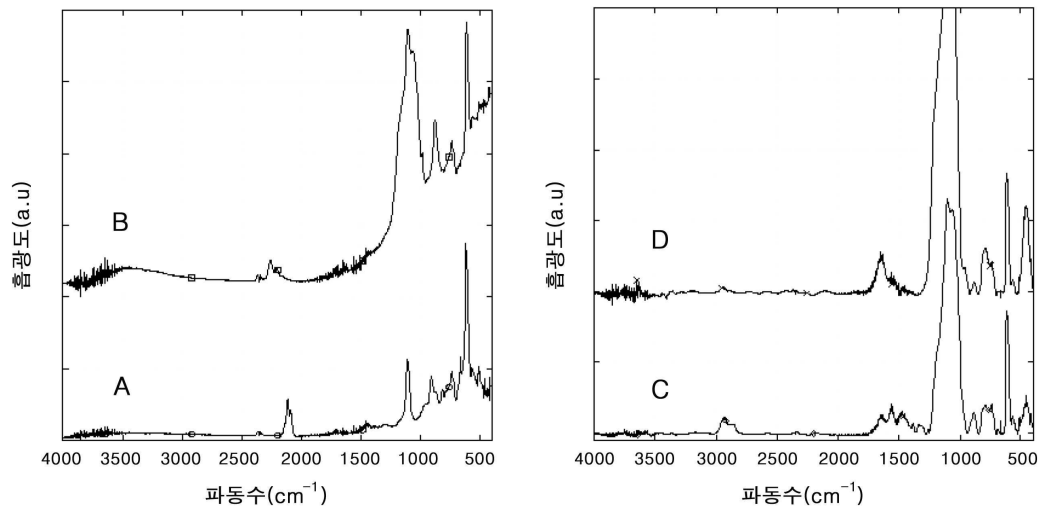
도면2



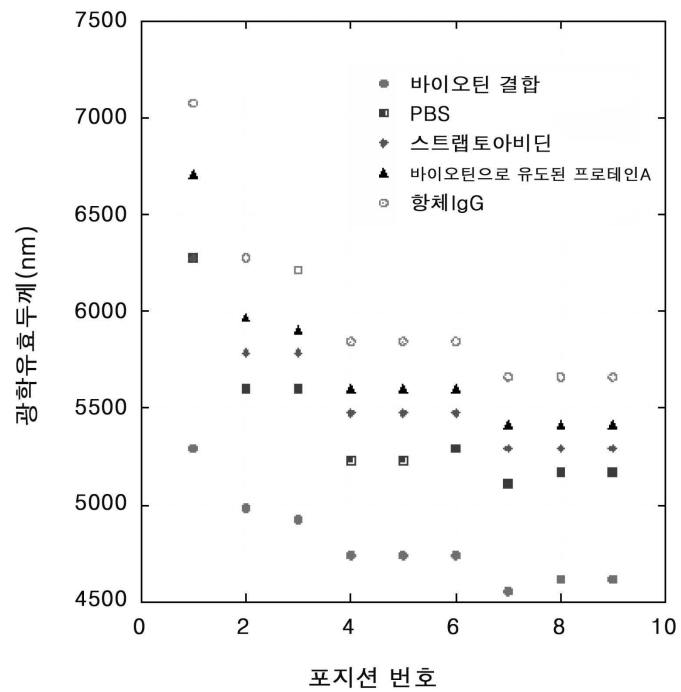
도면3



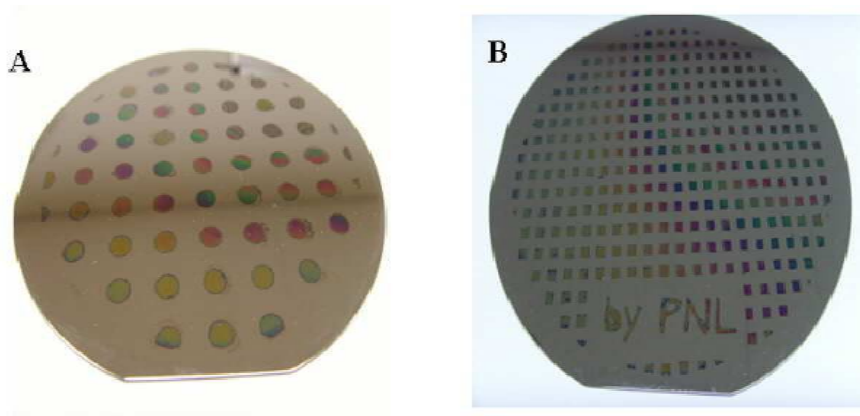
도면4



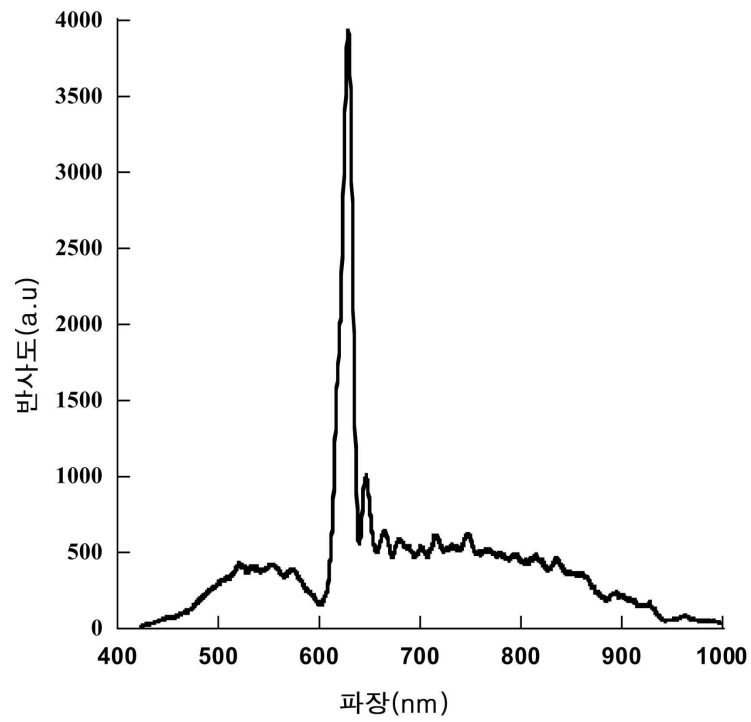
도면5



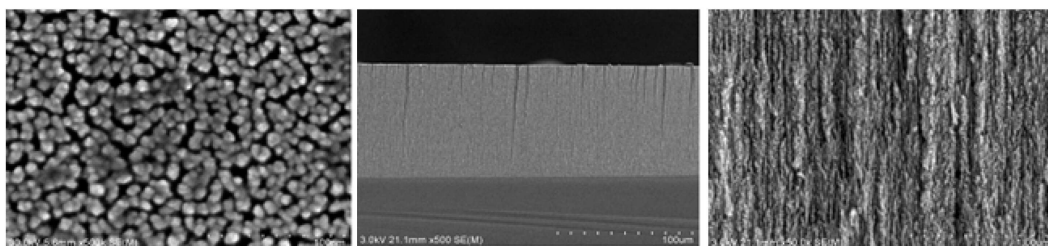
도면6



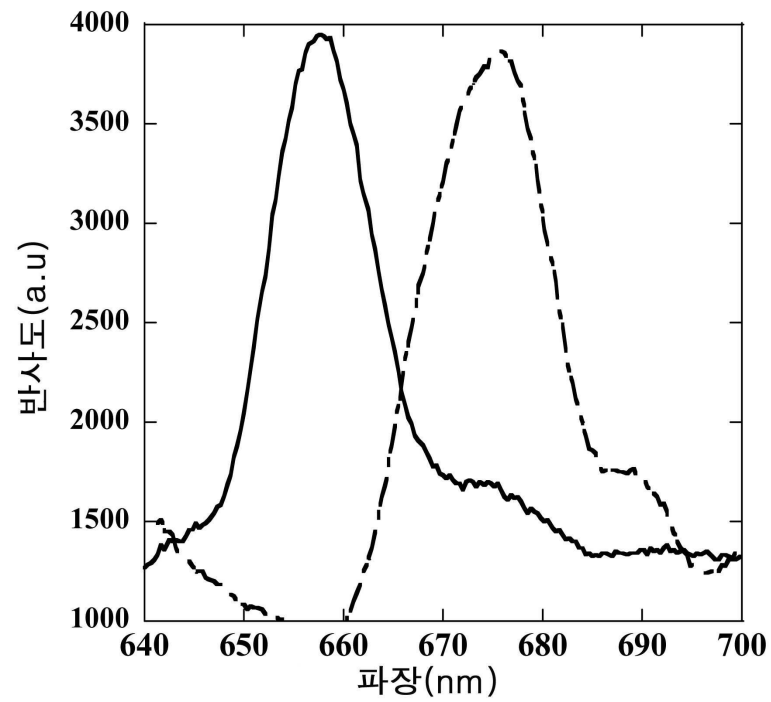
도면7



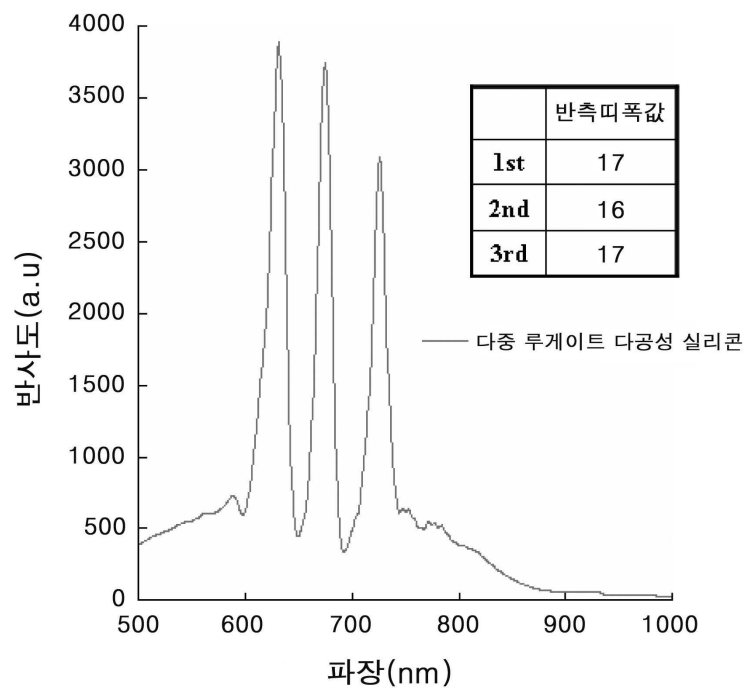
도면8



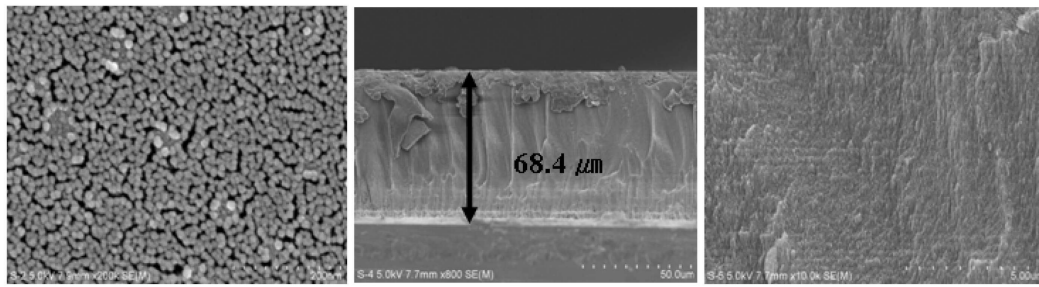
도면9



도면10



도면11



도면12

