







2009년 2월 석사학위 논문

면역 단백질 감지를 위한 다공성 실리콘 나노바이오센서

조선대학교 대학원

화 학 과

박재 현



면역 단백질 감지를 위한 다공성 실리콘 나노바이오센서

Porous Silicon Nanobiosensor for Detection of Immunoprotein

2009년 2월 25일

조선대학교대학원

화 학 과

박재 현



면역 단백질 감지를 위한 다공성 실리콘 나노바이오센서

지도교수 손 홍 래

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함.

2008년 10월

조선대학교 대학원

화 학 과

박재 현



박재현의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 조 성 동 교수 (인)

위 원 조선대학교 이 범 규 교수 (인)

위 원 조선대학교 손 홍 래 교수 (인)

2008년 11월

조선대학교 대학원



LIST

Chapter 1. Fabrication of Random DBR Porous Silicon Interferometer for Biosensor

Abstract

I. Introduction

$I\!\!I$. Experimental Section

- 1. Materials & Instrument
 - 1-1. Materials
 - 1-2. Instruments
- 2. DBR 다공성 실리콘의 합성
 - 2-1. 다공성 실리콘의 합성
 - 2-2. DBR 다공성 실리콘의 합성 조건
 - 2-2. DBR 다공성 실리콘의 합성
- 3. 바이오칩으로의 개발
 - 3-1. 다공성 실리콘의 열적 산화
 - 3-2. 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화
 - 3-3. 단백질(avidin)의 탐지

III. Results and Discussion

- DBR 다공성 실리콘의 합성 결과
 1-1. DBR 다공성 실리콘의 반사파장 측정
 1-2. 전자주사 현미경(FE-SEM) 측정
 바이오칩으로 개발 결과
 단백질(avidin)의 탐지 결과
- **IV.** Conclusion
- V. References

Chapter 2. Detection of Protein Based on Biotin-Modified Multi-encoded Rugate PSi Interferometer

Abstract

I. Introduction

II. Experimental Section

- 1. Materials & Instrument
 - 1-1. Materials
 - 1-2. Instruments
- 2. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 합성
- 3. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 바이오센서 개발
 - 3-1. 다공성 실리콘의 열적 산화
 - 3-2. 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화
 - 3-3. Biotin tetraflourophenyl ester의 합성
 - 3-4. 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide의 합성
 - 3-5. (3-aminopropyl)trimethoxysilane으로 유도화된 다공성 실리콘과 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide의 표면 유도체화
- 4. 바이오 물질의 탐지
- 5. 탐지한계 측정

$\blacksquare.$ Results and Discussion

- 1. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 합성 결과
- 2. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 바이오센서 개발 결과
 - 2-1. Biotin으로 유도된 rugate 다공성 실리콘 개발 결과
 - 2-2. 표면 고정화 작업의 정도 확인
- 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘을 이용한 단백질의 탐지 결과
 3-1. rugate 다공성 실리콘을 이용한 단백질의 탐지



- 3-2. 탐지한계 측정 3-3. BET 측정 결과
- **W.** Conclusion
- **V. References**

Chapter 3. Fabrication of DBR Porous Silicon by Asymmetric Electrode Configuration using Multiple Template

Abstract

I. Introduction

$\ensuremath{\mathbbm I}$. Experimental Section

- 1. Materials & Instrument
 - 1-1. Materials
 - 1-2. Instruments
- 2. 비대칭 식각기술에 의해 광한 인코딩된 다공성 실리콘의 개요
- 3. 비대칭 식각기술에 의해 광한 인코딩된 다공성 실리콘의 합성
 - 3-1. Multi-arrayed DBR 다공성 실리콘의 합성
 - 3-2. 4inch 실리콘 웨이퍼를 이용한 비대칭 다공성 실리콘의 합성

${\rm I\!I\!I}.$ Results and Discussion

- 1. 비대칭 식각기술에 의해 광한 인코딩된 다공성 실리콘의 합성 결과
 - 1-1. Multi-arrayed DBR 다공성 실리콘의 합성 결과
 - 1-2. 4 inch 실리콘 웨이퍼를 이용한 다공성 실리콘의 합성 결과

IV. Conclusion

V. References

Chapter 4. Porous Silicon Nanobiosensor for Detection of Immunoprotein

Abstract

I. Introduction

II. Experimental Section

- 1. Materials & Instrument
 - 1-1. Materials
 - 1-2. Instruments
- 2. Template를 이용한 multi-arrayed 다공성 실리콘의 합성
- 3. 바이오칩으로의 개발
 - 3-1. 다공성 실리콘의 열적 산화
 - 3-2. 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화
 - 3-3. (3-aminopropyl)trimethoxysilane으로 유도화된 다공성 실리콘 과 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide의 표면 유도체화
- 4. FT 변환에 의한 증폭
- 5. 바이오 물질의 탐지

${\rm I\hspace{-1.5mm}I}$. Results and Discussion

- 1. Multi arrayed 다공성 실리콘의 파장 측정 결과
- 2. Multi arrayed 다공성 실리콘의 바이오센서 제작 결과
 - 2-1. Multi arrayed 다공성 실리콘의 유도체화
 - 2-2. Multi arrayed 다공성 실리콘의 아민화 정도 확인
- 3. Multi arrayed 다공성 실리콘을 이용한 Human IgG의 탐지 결과

IV. Conclusion

V. References

LIST OF TABLES

Table 1. Porosity and etch-rate of current

Table 2. Etching condition of DBR PSi for 30mA and 300mA

Table 3. surface area of oxidized PSi, biotin-functionalized PSi,Binding streptavidin PSi

LIST OF FIGURES

Figure 1. Mechanism of Si oxidation during the formation of porous Si Figure 2. Schematic diagram of the etch cell with the counter electrode(cathode) arranged asymmetrically, used to generate the porous silicon.

Figure 3. porosity and refletive index of Looyenga

Figure 4. Reflectivity and photography of DBR porous silicon

Figure 5. SEM image of DBR PSi. (a) Surface of SEM image of DBR PSi. (b) Cross-sectional of SEM image of DBR PSi indicating that the thickness of DBR PSi is about 12.2µm. (c) Detailed cross-sectional SEM image of porous nanostructure in a PSi film. HC and LC indicate low current and high current, respectively.

Figure 6. Optical reflectivity spectra of oxidized DBR PSi, surface derivatized DBR PSi, biotin functionalized DBR.

Figure 7. Optical reflectivity spectra of biotin-functionalized DBR PSi sample before (red) and after (blue) exposure of avidin.

Figure 8. History of biosensor

Figure 9. Detection mechanism of biosensor

Figure 10. Reflectivity of multi-encoded rugate PSi

Figure 11. FE-SEM image of multi-encoded rugate PSi

Figure 12. Diffuse reflectance FT-IR spectra of (A) triply encoded rugate PSi, (B) thermally oxidized rugate PSi, (C) the wafer after functionalization of the rugate PSi layer with (3-aminopropyl)trimethoxysilane, and (D) rugate PSi functionalized with biotin.

Figure 13. Optical reflection spectra of biotin-fuctionalized rugate PSi sample before (red) and after (blue) exposure of avidin(A) and streptavidin(B), The green line in each case are the difference

between spectra obtained in the presence and absence of protein. Figure 14. Plots for showing the detection limits of protein at 2 pM by using differential graph.

Figure 15. Schematic diagram of the synthesis of multi-arrayed PSi.

Figure 16. Reflectivity and photography of multi-arrayed PSi.

Figure 17. Shift of wavelength by distance.

Figure 18. FE-SEM image of multi-arrayed DBR PSi.

Figure 19. Photography and reflective spectra 4inch PSi.

Figure 20. Photoluminescence and photogrphy of n-type PSi.

Figure 21. Schematic diagram of the synthesis of multi-arrayed PSi.

Figure 22. Schematic diagram and photography of the synthesis of multi-arrayed PSi.

Figure 23. FE-SEM image of multi-arrayed PSi.

Figure 24. Reflective spectra and effective optical thickness of multi-arrayed PSi.

Figure 25. Diffuse reflectance FT-IR spectra of (A) triply encoded rugate PSi, (B) thermally oxidized rugate PSi, (C) the wafer after functionalization of the rugate PSi layer with (3-aminopropyl)trimethoxysilane, and (D) rugate PSi functionalized with biotin.

Figure 26. Optical reflective spectra of protein A-functionalized PSi sample before (red) and after (blue) exposure of human IgG.

Figure 27. Change of effective optical thickness after addition of each protein



LIST OF SCHEMES

Scheme 1.

- Scheme 2.
- Scheme 3.
- Scheme 4.
- Scheme 5.
- Scheme 6.

Scheme 7.

Chapter 1. Fabrication of Random DBR Porous Silicon Interferometer for Biosensor

Park, Jaehyun

Advisor : Prof. Sohn, Honglae, Ph.D, Department of Chemistry, Graduate School of Chosun University

Abstract

Porous silicon obtained by chemical or electrochemical dissolution of c-Si has shown a great quantity of applications and extensive works on this material has been reported both in the scientific and technological areas. The visible photoluminescence at room temperature of this material reported in 1990 by Cangam has attracted considerable interest due to the possibility of manufacture an integrated optical device on Si. Porous silicon multilavers. sometimes also called porous silicon superlattices, improve the feasibility of optical components realized from this interesting material : distributed Bragg reflectors(DBR) and Fabry-Perot interferential filters, Rugate filters, microcavities with controlled spontaneous emission properties. waveguides. colour-sensitive photodiodes, and resonant cavity light emitting diodes are some of them. By adjusting the electrochemical etching conditions such as alternating current densities, time, and HF concentration, the morphology and porosity of PSi can be easily controlled.Distributed Bragg reflector (DBR) PSi exhibits unique optical properties. DBR PSi has been typically prepared by an applying a computer generated

pseudo-square current waveform to the etch cell which results two distinct indices and exhibits photonic structure of Bragg filters. In this paper we investigate the use of a random distribution in the layer thicknesses in order to realize a broadband optical reflector and to such technological motivations, the study of random dielectric multilayers is of interest in the field of one dimensional light localization.

I. Introduction

최근 수 십 년간 전기 전자 및 금속 반도체기술이 눈부신 발전을 이룩하였 다면 21세기 현대과학에서는 새로운 형태나 특성을 연구하는 영역으로 나노 과학(nanoscience) 및 나노 기술(nanotechnology)^[1]이 급속히 발전하고 있 다. 나노과학의 한 분야로 다공성 실리콘을 들 수 있는데 반도체 재료인 실 리콘 웨이퍼를 전기화학적인 식각^[2-6]을 통하여 실리콘웨이퍼 표면에 나노 크 기의 기공과 나노 입자를 갖게 하는 것이다. 다공성 실리콘이 형성되는 원리 는 실리콘이 HF (Hydrofluoric acid) 하에서 전류를 흘려주었을 때 실리콘 에 있는 홀의 도움을 받아 H2SiF6와 H2(g)를 생성 하므로 실리콘 고체가 식 각되어 실리콘 웨이퍼 표면에 일정한 패턴을 갖는 다공성 기공(pore)을 형성 하게 된다^[7]. 실리콘 웨이퍼는 형태에 따라 n-type 과 p-type으로 나누어지 는데 이런 실리콘 웨이퍼를 식각하여 형성된 다공성 실리콘 칩은 독특한 두 가지 광학적 특성인 광 발광성 (photoluminescence)^[8]과 광 반사성 (optical reflectivity)^[9]을 지닌다. p-type 실리콘 웨이퍼 통해 합성된 다공성 실리콘 은 백색광원을 이용해 반사스펙트럼을 측정하면 다공성 실리콘 층으로 인하 여 반사된 파장들이 보강 또는 상쇄 간섭을 하여 Fabry-Pérot fringe pattern을 준다. 이런 fringe pattern은 기공내부에 화학물질이 채워져 들어 가거나 빠져나갈 때 다공성층의 굴절률의 변화를 초래하여 장파장 혹은 단파 장 방향으로 변위를 하게 된다. Fringe pattern은 원하는 파장의 반사피크 를 만들 수 없다는 단점을 포함하고 있으며 이를 극복하기 위하여 다층의 다 공성 실리콘을 제작하여야 한다. 다공성의 기공은 흘려주는 전류세기의 차이 나 전기화학적 식각 시간, HF용매의 농도, 그리고 실리콘 웨이퍼의 형태에 따라 기공의 지름이나 깊이를 수 나노미터에서 수 마이크론 까지 원하는 용 도에 맞게 조절할 수 있다.^[10-11] 이러한 원리를 이용해 Fabry-Pérot fringe pattern을 가지는 단층의 정 전류 대신 흘려주는 전류의 형태를 네모파 (square wave)^[12-13]나 사인파(sine wave)^[14-15]와 같이 일정한 패턴으로 다 른 전류를 반복적으로 여러 번 흘려주게 되면 한 가지 특정한 빛만 반사하는 독특한 광학적 특징을 가진 다층의 다공성 실리콘을 제조할 수 있다. 본 연 구에서는 다층 다공성 실리콘의 한 종류인 네모파를 이용해서 합성되는

DBR(Distributed Bragg Reflectors) 다층 다공성 실리콘을 형성하는 원리 와 원하는 반사파장을 갖도록 합성하는 방법에 대해서 알아 볼 것이며 또한 이렇게 합성된 다층의 DBR 다공성 실리콘을 합성하여 바이오센서로 개발하 여 바이오 물질인 단백질(avidin)을 탐지하는 연구를 수행하였다.

$I\!\!I$. Experimental Section

1. Materials & Instrument

1-1. Materials

나노(nm) 크기의 기공과 마이크론(µm) 크기의 두께를 형성하는 DBR 다공 성 실리콘을 합성하기 위해 0.08~0.12 mΩ 의 저항 값을 갖는 p⁺⁺-type 실 리콘 웨이퍼를 사용하였다. 전기화학적 부식을 시키기 위한 부식용매는 hydrofluoric acid (ACS reagent, Aldrich) 와 순수한 ethanol (ACS reagent, Aldrich)의 혼합용액을 사용하였다. 부식시키기 위한 Etching cell 은 Teflon cell을 사용하였고, +전극에는 platinum wire로 -전극에는 aluminum foil을 사용하였다. DBR 다공성 실리콘을 바이오센서로 개발하기 위해 3-aminopropyltrimethoxysilane, biotin, 1-(2-(dimethyl-amino) propyl)-3-ethylcarbodiimidehydro-chloride , avidin(Aldrich Chemicals) 을 구입하여 사용하였다.

1-2. Instrument

실리콘 웨이퍼에 전기화학적으로 부식(Electrochemical Etching)을 시키기 위해 Galvanostat(soucemeter2420)을 이용하였다. 합성된 DBR 다공성 실 리콘은 UV-VIS integrated analysing system (Ocean Optics USB-2000 spectrometer)을 사용하여 샘플의 reflectivity를 측정하였다. 또한 부식된 표면을 측정하기 위해 전자주사 현미경(FE-SEM)을 사용하여 확인하였다.

2. DBR 다공성 실리콘의 합성

2-1. 다공성 실리콘의 합성

다공성 실리콘은 반도체 재료인 실리콘 웨이퍼를 전기화학적인 식각을 통 하여 실리콘 웨이퍼 표면에 나노 크기의 기공(pore)과 나노 입자를 갖게 한 다. 다공성 실리콘이 형성되는 원리는 Figure 1에 나타와 있는 바와 같이 실 리콘을 HF (Hydrofluoric acid) 하에서 전류를 흘려주었을 때 실리콘에 있 는 홀의 도움을 받아 H₂SiF₆와 H₂(g)를 생성 하므로 실리콘 고체가 식각되 어 실리콘 웨이퍼 표면에 일정한 패턴을 갖는 다공성 기공을 형성하게 된다.



Figure 1. Mechanism of Si oxidation during the formation of porous Si

다공성의 기공은 흘려주는 전류세기의 차이나 전기화학적 식각 시간, HF 용매의 농도, 그리고 실리콘 웨이퍼의 형태에 따라 기공의 지름이나 깊이를 수 나노미터에서 수 마이크론 까지 원하는 용도에 맞게 조절할 수 있다. 합 성된 다공성 실리콘은 백색광원을 이용해 반사스펙트럼을 측정하면 다공성 실리콘 층으로 인하여 반사된 파장들이 보강 또는 상쇄 간섭을 하여 Fabry-Pérot fringe pattern을 갖는다. 이런 fringe pattern은 기공내부에 화학물질이 채워져 들어가거나 빠져나갈 때 다공성층의 굴절률의 변화를 초 래하여 장파장 혹은 단파장 방향으로 변위를 하게 된다. 이러한 광학적 성질 은 특히 센서로서의 응용분야에 널리 이용되어 많은 연구가 진행되고 있다. fringe pattern은 Bragg 식(1)에 의하여 생성되며 분석될 수 있다.

$$m\lambda = 2nL \bullet \sin\Theta \tag{1}$$

이 식은 이번 연구에서 사용되는 빛의 입사각인 ⊖=90°일 때, mλ = 2nL이 므로 보강 및 상쇄간섭을 하는 파장은 다공성 실리콘의 두께(L)와 굴절율(n) 이 관여한다고 볼 수 있다.

단층의 다공성 실리콘은 원하는 파장의 반사피크를 만들 수 없다는 단점을 포함하고 있으며 이를 극복하기 위하여 다층의 다공성 실리콘을 제작하여야 한다. 다공성 실리콘 층을 다층으로 쌓을 경우 두 가지 방식이 있는데 이를 rugate 또는 DBR 구조를 갖는 다공성 실리콘이라 한다. 다층 다공성 실리 콘은 부식과정 동안 전류량을 주기적으로 변화 시켜 합성할 수 있다. DBR 다공성 실리콘은 네모파 전류를 그리고 rugate 다공성 실리콘은 사인파 전 류를 이용하여 합성한다. 여기서는 사각파를 이용한 DBR 다공성 실리콘의

합성하였으며 방법은 Figure 2과 같은 장치를 사용하여 서로 다른 두 전류 를 이용하여 반복적으로 흘려주면서 식각하였다. 특정한 빛만을 반사하는 Bragg 식으로 나타내기 위해 정리하여 표현하면 다음과 같다.

$$m\lambda_{\text{Bragg}} = 2(L_1n_1 + L_2n_2) \tag{2}$$

여기에서 L₁ : 낮은 전류로 인해 생긴 다공성층의 두께, n₁ : 낮은 전류로 인 해 생성된 굴절률, L₂ : 높은 전류로 인해 생성된 다공성층의 두께 n₂ : 높은 전류로 인해 생성된 굴절률로 볼 수 있다.



Figure 2. Schematic diagram of the etch cell with the counter electrode(cathode) arranged asymmetrically, used to generate the porous silicon.

p⁺⁺- type의 실리콘 웨이퍼(B dopped, <100>, 0.08~0.12 mΩ)를 백금전 극을 이용하여 Galvanostat (Keithley 2420)을 통하여 전류를 흘려주면 전 기화학적 식각과정을 거쳐 합성된다. 일정한 패턴의 기공(pore)과 깊이 (depth)를 갖는 다공성 실리콘을 합성하기 위한 식각 용매로는 Hydro fluoric acid (48% by weight: Aldrich Chemicals)와 Ethanol (Aldrich

Chemicals)을 3 : 1의 부피비로 혼합하여 사용하였으며 전류는 원하는 조건 을 current power source사용하여 흘려주었다. 이 모든 공정은 Teflon cell 에서 수행하였으며 식각 후에는 Ethanol 과 아르곤 가스를 이용하여 세척, 건조하였다.

2-2. DBR 다공성 실리콘의 합성 조건

DBR 다공성 실리콘은 서로 다른 두 종류의 전류를 반복해 줌으로서 제조 된다. 이는 다른 두 층의 굴절률(n)과 부식된 층의 두께(d)에 의해서 얻어지 며 그 곱은 반사파장(λ)의 4분의 1의 값을 갖게 된다^[7-8].

$$dH \times nH = dL \times nL = \lambda / 4$$
 (3)

p⁺⁺-type 단결정 실리콘 웨이퍼를 준비하고 부식용매는 HF와 Et OH를 3 : 1 부피비로 혼합하여 제조하였다. Galvanostat를 이용하여 전기화학적인 식각을 해주었다. 이때 사용한 식각 조건은 30mA와 300mA를 각각 300초 동안 정 전류를 흘려주어 식각하였다. 식각을 통하여 제작된 다공성 실리콘 을 바탕으로 다공성도(porosity), 식각률(etch-rate), 그리고 굴절률 (refractive index) 측정하였다. 전류에 대한 다공성의 값은 다음과 같은 식 ^[7-8]에 기인하여 구하였다.

$$P = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \tag{4}$$

m₁은 순수한 웨이퍼의 무게이고, m₂는 부식후 웨이퍼의 무게, m₃는 부식부 분을 제거하고 남은 웨이퍼의 무게이다. 무게를 측정하였으며 부식 부위의 다공성 필름을 제거하기 위해 0.1M NaOH를 이용하였고 식각률 측정의 측 정을 위해 전류의 시간에 따른 실콘 웨이퍼의 식각율 측정은 다음과 같은 식 ^[7-8]에 기인하여 구하였다.

$$S = \frac{m_1 - m_3}{s \times d} \tag{5}$$

s는 부식된 부분의 넓이(1 cm²)이고, d는 실리콘의 밀도(2.33 g/mL)이다. Table 1은 30mA와 300mA의 전류를 흘려주었을 때 다공성과 식각률을 측 정한 것이다.

전류	m_1	m_2	m_3	다공성도(%)	식각률(nm/s)
30	0.2239	0.2223	0.2190	33	70
300	0.2435	0.2399	0.2349	43	125

Table 1. Porosity and etch-rate of current

식각이 끝난 다공성 실리콘의 굴절률은 Looyenga의 그래프(Figure 3)를 이용하여 다공성도과 굴절율의 관계를 바탕으로 측정하였다.



Figure 3. porosity and refletive index of Looyenga

2-3. DBR 다공성 실리콘의 합성

이를 통하여 얻어진 값을 통하여 600nm의 파장을 가지는 DBR 다공성 실 리콘을 제작하는 조건을 구하여 합성하였다. p⁺⁺-type 단결정 실리콘 웨이 퍼를 준비하고 부식용매는 HF와 EtOH를 3 : 1 부피비로 혼합하여 제조하 였다. Galvanostat를 이용하여 전기화학적인 식각을 해주었다. 이때 사용한 식각 조건은 30mA와 300mA를 교대로 20회 반복하여 전류를 흘려주어 식 각하였다. 식각 후 EtOH로 세척하고 N₂가스로 건조하였다.

3. 바이오칩으로 개발

3-1. 다공성 실리콘의 열적 산화

전기화학적 식각을 통해 얻어진 다공성 실리콘은 열적산화를 통하여 그 표 면이 Si-OH로 종결되어 산화된 다공성 실리콘을 제작하였다. 열적 산화는 furnace (Thermolyne F6270-26 furnace equipped with controller)를 이 용하여 300℃에서 3시간 동안 산화시켰다. 산화가 끝난 후 얻어진 다공성 실리콘은 에탄올, CH₂Cl₂, 그리고 HF 순서대로 세척하고 Ar gas 하에서 사 용하기 전 까지 건조하였다.

3-2. 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화

제작된 다공성 실리콘을 바이오센서로 응용하기위해 표면을 감지인식체로 유도하여 바이오 분자를 인식할 수 있도록 한다. 산화된 다공성 실리콘과 3-aminopropyltrimethoxysilane(10 mmol, 99%, Aldrich Chemicals) 1.8ml를 넣고 80℃로 19시간동안 가열하여 아민그룹을 갖는 다공성 실리콘 표면을 제작한다. 가열한 후 toluene, acetone, 그리고 ethanol 순으로 세 척한 다음 질소가스로 건조시켜 준다. 다음은 생물분자를 인식할 수 있는 감 지인식체로서 biotin을 표면에 고착화시킨다. biotin 100mg을 methylene chloride 100ml에 넣고 용해시킨다. 완전히 그다음에 1-(2-(dimethyl-amino)propyl)-3-ethylcarbodiimidehydro - chloride , EDC) 200mg (1mmol)를 첨가 한여 1시간동안 용해를 시킨다. 그리고 열적 산화가 된 rugate 다공성 실리콘칩을 첨가하여 overnight 반응을 한다. 반응 이 종결된 rugate 다공성 실리콘 칩을 빼내어, toluene, methylene chloride. 그리고 phosphate-buffered solution (PBS, pH = 7.4) 의 용액 들로 3회씩 세척을 한다.

3-3. 단백질(avidin)의 탐지

Biotin으로 유도화된 DBR 다공성 실리콘 칩을 이용하여 바이오 물질을 선택적으로 탐지하는 연구를 수행하였다. flow cell에 다공성 실리콘을 고정 시키고 바이오 물질로는 PBS에 20μM로 농도로 용해된 단백질(avidin)을 사 용하여 0.8mL/min 유속으로 흘려주었다.

\square . Results and Discussion

1. DBR 다공성 실리콘의 합성 결과

1-1. DBR 다공성 실리콘의 파장 측정

앞에서의 실험을 통해 특정 전류에 대한 다공성도, 식각률 그리고 굴절률 을 실험을 통해 구하였다. 이를 바탕으로 서로 다른 전류로 형성되는 두 층 의 상호 보강, 상쇄 간섭으로 하나의 특정 파장만을 반사하게 되는 DBR(Distributed Bragg Reflectors) 다층 다공성 실리콘을 합성하였다. Table 2는 30mA와 300mA의 전류에 대한 다공성과 굴절율, 부식율을 Figure 2를 통해 얻어낸 값이다. 그리고 부식층의 두께는 식 (1)에서 굴절율 과의 곱은 반사파장의 1/4값을 갖는 150이 되어야 하기 때문에 두 층은 56.818nm와 78.947nm의 값을 갖게 된다. 두 층이 56.818nm와 78.947nm 의 두께를 갖기 위해서는 30mA와 300mA의 전류가 초당 40.695nm와 202.794nm의 부식율을 갖기 때문에 각각 1.40초와 0.39초의 부식시간을 주 게 된다.

Table 2. Etching condition of DBR PSi for 30mA and 300mA

전류	다공성(%)	굴절율	광학두께(nm)	식각율(nm/s)	부식시간
30	27.595	2.64	40.695	56.818	1.40
300	57.394	1.90	202.794	78.947	0.39

이러한 조건을 바탕으로 실리콘 웨이퍼에 두 전류를 사용하여 부식조건을 흘려주게 되면 Figure 4과 같이 붉은색을 띠는 630nm에서 하나의 파장만을 반사하며 유효띠 넓이 17nm를 갖고 있는 DBR 다공성 실리콘을 합성할 수 있게 된다.



Figure 4. Reflectivity and photography of DBR porous silicon

1-2. 전자주사 현미경(FE-SEM) 측정

DBR 다층 다공성 실리콘칩을 합성한 후 광학적 특성이 나타나는 이유를 알아보기 위해서 다공성 실리콘의 단면을 주사 전자 현미경을 이용해서 측정 해 본 결과 표면의 기공 크기는 20-30nm 정도이며, 이 기공을 이용하여 56 × 50 × 40Å의 크기를 갖는 avidin의 탐지가 가능하게 되었다. 식각된 다공 성 실리콘의 두께는 12µm 정도 되었다(Figure 5(b)). 두께의 경우는 DBR을 합성 하는 과정에 있어서 더 많은 주기성만 있다면 조절이 가능하다. 그리고 낮은 전류와 높은 전류에 의해서 형성된 층 또한 확인 할 수 있었다.(Figure 5(c)).



Figure 5. SEM image of DBR PSi. (a) Surface of SEM image of DBR PSi. (b) Cross-sectional of SEM image of DBR PSi indicating

that the thickness of DBR PSi is about 12.2µm. (c) Detailed cross-sectional SEM image of porous nanostructure in a PSi film. HC and LC indicate low current and high current, respectively.

2. 다공성 실리콘의 바이오칩으로 개발 결과

합성된 DBR 다공성 실리콘을 바이오 센서로 응용하기 위해 표면을 화학 적으로 유도체화 시키기 위해 scheme 1과 같이 수행하였다.



Scheme 1.

공기 중이나 수용액 상에서 불안정한 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화를 통해 OH의 작용기를 갖도록 변화시켰다. 300 ℃에서 열적 산화된 다공성 실 리콘의 표면은 Si-H에서 Si-OH로 변화된다. DBR 다공성 실리콘 필름이 열적 한화를 하게 되어 얻어진 결과로 반사 스펙트럼이 589nm 로 46 nm정 도 단파장으로 이동을 하였는데, 이는 Si에서 SiO₂로 변하면서 굴절률의 감 소가 일어났기 때문이다. Si-OH로 표면이 산화된 다공성 실리콘을 Scheme 1과 같이 3-(aminopropyl)trimethoxysilane과 함께 반응 시키면 표면이 아 민그룹으로 유도체화 된다. 또한 굴절율이 증가하면서 반사피크도 장파장으 로 23 nm 이동하였다. Scheme 2에서 보여주는 방법으로 biotin과 기질이 반응을 하게 되면 biotin으로 작용화된 다공성 실리콘을 이용하여 avidin-biotin 연구를 이끌어 낼 것이다. 반사피크 역시 굴절율이 증가함에 따라 평균 24nm 장파장으로 이동하였다. 다음과 같이 바이오틴으로 유도화



하는 과정을 그래프로 나타내었다(Figure 6).



Figure 6. Optical reflectivity spectra of oxidized DBR PSi, surface derivatized DBR PSi, biotin funtionalized DBR.

3. DBR 다공성 실리콘을 이용한 단백질(avidin)의 탐지 결과

유도체화된 다공성 실리콘을 flow cell에 고정시키고 Phospate buffer solution(PBS)을 흘려주며 최초의 반사파장을 측정한다. 다음 cell에 PBS에 avidin(20uM)을 녹여 0.8mL/min의 속도로 흘려준다. Figure 7는 biotin으 로 유도화된 DBR 다공성 실리콘의 칩에 avidin을 흘려주었을 때 반사 스펙 트럼의 변화를 나타낸 그림이다.



Figure 7. Optical reflectivity spectra of biotin-functionalized DBR PSi sample before (red) and after (blue) exposure of avidin.

반사 스펙트럼이 17 nm 증가를 관찰 할 수 있었다. 이는 biotin으로 유도 화된 다공성 실리콘 필름에 avidin과 결합하여 굴절률의 변화가 일어났기 때 문이다. 이러한 증가는 수용액 상의 avidin의 결합으로 인해 발생되었다고 간주된다. 또한 순수한 PBS 용액을 흘려주었을 때에는 아무런 변화가 일어 나지 않았다.

IV. Conclusion

DBR 다공성 실리콘은 네모파 전류를 이용하여 전기화학적 부식을 통해서 합성한 것으로 p⁺⁺-type Si wafer에 임의의 두 전류를 선택하여 전류의 다 공성도, 굴절율, 식각율등을 측정하고 원하는 파장 영역에서 합성할 식각 조 건을 구하여 DBR 다공성 실리콘을 제작할 수 있다. 제작된 DBR 다공성 실 리콘은 매우 얇은 반사 스펙트럼을 가지고 있으며 전자주사현미경을 통해 표 면에 20-30 nm의 크기의 기공과 낮은 전류와 높은 전류에 의해서 형성된 단면 층 또한 확인 할 수 있었다. 또한 합성된 DBR 다공성 실리콘을 이용하 여 단백질(avidin)을 탐지하는 바이오센서로 개발하였다. 바이오틴을 유도화 한 DBR 다공성 실리콘은 biotin-avidin 자리결합을 하여 굴절율의 증가를 유도하여 17nm 장파장으로 이동함을 관찰할 수 있었다.

V. References

[1] Diesinger. H.; Bsiesy, A.; Heino, R. *phys. stat. sol.* **2003**, 197, 561–565.

[2] H. Sohn, S. Letant, M. J. Sailor, and W. C. Trogler, "Detection of fluorophosphonate chemical warfare agent by catalytic hydrolysis with a porous silicon interferometer", J. Am. Chem. Soc., vol. 122, pp. 5399, 2000.

[3] A. Bsiesy, J. C. Vial, F. Gaspard, R. Herino, M, Ligeon, F. Muller, R. Romestain, A. Wasiela, A. Halimaoui, and G. Bomchil, "Photoluminescence of high porosity and of electrochemically oxidized porous silicon layers", Surf. Sci., vol. 254, pp. 195–200, 1991.

[4] L. T. Canham, "Silicon quantum array fabrication by electrochemical and chemical dissolution as wafers", Appl. Phys. Lett., vol. 57, pp. 1046–1048, 1990.

[5] A. G. Cullis, and L. T. Canham, "Visible light emission due to quantum size effects in highly porous crystalline silicon ", Nature, vol. 353, pp. 335–338, 1991.

[6] F. Gaspard, A. Bsiesy, M. Ligeon, F. Muller, and R. J. Herino, "Exchange mechanism responsible for p-type silicon dissolution during porous silicon formation", Electrochem. Soc., vol. 136, pp. 3043-3046, 1989.

[7] H. Gerischer, P.Allogue, V.Kieling ; *Ber. Bunsenges. phys. chem.* 1993, vol.97,p.753

[8] Dancil, K. S.; Greiner, D. P.; Sailor, M. J. J. Am. Chem. Soc, 1999,121, 7925-7930.

[9] Guerrero-Lemus, R.; Ben-Hander. F, A.; Fierro; G.; Hernadez-Rodriuez, C.; *Phys. Stat. Sol.***2003**, 197, 137-143.

[10] P. C. Searsonm J. M. Macaulay and F. M. Ross, J. Appl. Phys. 72, 253, (1992).

[11] C. Levy-Clement, A. Lagoubi, and M. J. Tomkiewucz, Electro-chem. Soc. **278**, 840,(1997).

[12] J. Park, S. Cho, Y. C. Ko, and H. Sohn, J. Korean Phys. Soc. 50, 695 (2007).

[13] S. Jang, J. Kim, Y. Koh, Y. C. Ko, H.-G. Woo, and H. Sohn, J. Nanosci. Nanotechnol. **7**, 4049 (2007).

[14] B. -J. Lee, S. Jang, and H. Sohn, Solid State Phenom. **491**, 124 (2007).

[15] J. Kim, Y. Koh, S. Jang, Y. C. Ko, H. -G. Woo, and H. Sohn,J. Nanosci. Nanotechnol. 7, 4165 (2007).

Chapter 2. Detection of Protein Based on Biotin-Modified Multi-encoded Rugate PSi Interferometer

Park, Jaehyun Advisor : Prof. Sohn, Honglae, Ph.D, Department of Chemistry, Graduate School of Chosun University

Abstract

A biosensor has been developed based on induced wavelength shifts in the visible reflection spectrum of appropriately derivatized films of porous silicon (PSi) semiconductors. Multi-encoded rugate PSi was generated by an electrochemical etching of silicon wafer using an electrode configuration in aqueous ethanolic HF solution. Multi-encoded rugate PSi displayed three very sharp reflection bands whose reflection maxima varied spatially across the PSi. The sensor system studied consisted of a multilayer of PSi modified with biotin. The system was probed with various fragments of an aqueous protein analyte. The sensor operates by measurement of the reflection peaks in the white light reflection spectrum from the PSi layer. When the biotin-derivatized rugate PSi was exposed to protein in phosphate buffer solution (PBS), the molecular binding caused a change of its refractive index is detected as a shift in wavelength of these reflection peaks. A red-shift of reflective spectra were observed, when the biotin-modified rugate PSi was exposed to a flow of protein.

I. Introduction

나노기술(nanotechnology)이라 함은 원하는 구조의 제작과 대상구조의 관 찰을 원자 수준(나노미터 - 십억분의 일)에서 행하는 데 필요한 모든 기술을 총칭한다. 나노 과학(nanoscience)및 나노 기술(nanotechnology)^[1]은 21세 기 현대과학에서는 새로운 형태나 특성을 연구하는 영역으로 급속히 발전하 고 있으며 나노과학은 나노 소재의 합성 및 응용분야로 분류된다. 기계나 기 구에는 생명체의 감각기관에 해당하는 인간의 감지 능력을 초월하고, 시스템 의 효율성을 높이는 장치를 센서(Sensor)^[2] 라고 한다. 이러한 센서를 나노 과학과 접목한 것을 나노 센서(nanosensor)라고 불리우며 분자 수준의 조작 이 가능한 분자센서(molecular sensor)의 집적화 또는 나노 소재나 나노 구 조물의 특성을 이용한 센서를 의미한다^[3]. Figure 8은 바이오센서가 발전하 는 과정을 정리한 것이다. 생체물질과 전극간의 조합에 의하여 생화학적으로 중요한 물질을 측정할 수 있다는 것은 1962년 Clark와 Lyons^[4]에 의해 처 음으로 제안되었다. 1967년 Updike와 Hicks^[5]에 의하여 효소전극(enzyme electrode) 개념이 발표되었고, 그 후 1980년부터 '바이오센서'란 용어가 널 리 사용되면서 그 개념이 확대되었다.



Figure 8. History of biosensor

바이오센서는 측정대상물로부터 정보를 얻을 때 생물학적 요소를 이용하거 나 또는 생물학적 요소를 모방하여 인식 가능한 유용한 신호로 변환시켜주는 시스템이다^[6]. 나노기술은 바이오센서의 개발의 혁신을 이루었다. 바이오센서 란 생체감지물질(bio receptor)과 신호 변환기(signal transducer)로 구성되 어 인식 가능한 신호로 변환 하여 분석하고자하는 물질을 선택적으로 감지하 는 장치이다. 생체감지물질로는 특정 물질과 선택적으로 반응 및 결합할 수 있는 효소, 항체, 항원, 호르몬 수요체(hormone-receptor) 등이 있으며, 신 호 변환 방법으로는 전기화학(electrochemical), 형광, 발색, SPR(surface plasmon resonance), FET(fieldeffecttransistor), QCM(quartz crystal microbalance), 열센서 등 다양한 물리화학적 방법을 사용한다^[7-8]. Figure 9는 생체물질을 감지해내는 원리를 그림으로 나타낸 것이다.



Figure 9. Detection mechanism of biosensor

국미량의 분석물질을 감지하기 위해서는 센서의 광학적 전기적 신호변환의 개발이나 센서의 재료를 개발하는 방법으로 나노소재의 경우 그 광학적 특성 이 현재 많이 사용되고 있는데 이는 저분자 유기 형광 감지 체보다 매우 우 수하며 안정성 또한 매우 우수하기 때문이다^[9]. 금속 및 반도체 나노소자의 경우 그에 대한 광학적 특성에 관한 연구와 그들의 응용분야에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으나 생체에 응용되는 바이오칩으로는 독성 등의 이

유로 적용하기가 어렵기 때문에 이에 생체에 가장 안정한 실리콘을 바탕으로 한 센서의 개발은 매우 중요하다고 할 수 있다^[10]. 분자 인지 및 감지 집합체 를 통해서 protein, streptavidin, avidin 및 IgG 등과 같은 생체분자를 감지 하는데 중요한 도구로 될 것이다.

본 연구에서는 생체에 안정한 실리콘을 바탕으로 한 다층 다공성 실리콘의 반사피크는 원하는 파장에서 그 반사피크가 하나만 갖도록 조절하여 만들 수 있다는 장점을 발전 시켜 여러 개의 반사피크들이 원하는 파장들에서 상대적 인 세기를 조절할 수 있도록 할 수 있는 방법인 광학 인코딩(optical encoding) 기술을 개발 하였다. 다중 반사피크를 만들 수 있는 광학 인코딩 은 바코드 기술과 비교할 수 있으며 여러 가지 분석물질들을 단시간에 감지 할 수 있는 multiplex assay 기술로서 이를 다층 다공성 실리콘의 식각기술 에 적용하여 생물분자(avidin, streptavidin)를 감지하려고 한다. 또한 광학 신호를 증폭하여 생물분자의 감지한계를 측정하였다.

$I\!\!I$. Experimental Section

1. Materials & Instrument.

1-1. Materials

광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘을 합성하기 위해 0.08~0.12 mΩ 의 저항 값을 갖는 p⁺⁺-type 실리콘 웨이퍼를 사용하였다. 전기화학적 부식을 시키기 위한 부식용매는 hydrofluoric acid (ACS reagent, Aldrich) 와 순 수한 ethanol (ACS reagent, Aldrich)의 혼합용액을 사용하였다. 부식시키 기 위한 Etching cell은 Teflon cell을 사용하였고, +전극에는 platinum wire로 -전극에는 aluminum foil을 사용하였다. 바이오센서로 개발하기 위 해 3-aminopropyltrimethoxysilane, avidin, streptavidin (Aldrich Chemicals)을 구입하여 사용하였으며 아민과 결합할 biotin tetrafluorophenyl ester 을 합성하기 위해 triethylamine, 2,3,5,6-tetrafluorophenyl trifluoroacetate, Biotin (Aldrich Chemicals)을 구입하여 사용하였다. 또한 표면 유도체화 정도를 확인할 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide을 합성하기 위해 2,2'-Bipyridyl disulfide, 3-mercaptopropionic acid, silica gel column chromatography (Aldrich Chemicals)을 구입하여 사용하였다.

1-2. Instrument

FT-IR 스펙트라는 diffuse reflectance (Spectra-Tech diffuse reflectance attachment)방식을 이용하여 Nicolet model 5700을 이용 하여 측정 하였다. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 구조 형태는 SEM (FE-SEM, S-4700, Hitach)를 이용하여 측정하였다. 2-Thiopyridone의 방 출정도는 UV-vis spectrometer (UV-2401 PC, Shimazu)를 이용하여 측정 하였다. 표면 유된 rugae 다공성 실리콘 에서부터 2-thiopyridone의 방출정 도의 양의 결정은 흡광파장을 343 mm의 파장을 고정하여 측정을 하였다.

2. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 합성

광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 합성 방법은 순수한 p⁺⁺- type의 실리콘 웨이퍼(B dopped, <100>, 0.0008~0.0012 Ω)를 백금전극을 이용하 여 Galvanostat (Keithley 2420)을 통하여 전류를 흘려주면 전기화학적 식
각과정을 거쳐 합성된다. 일정한 패턴의 기공(pore)과 깊이(depth)를 갖는 다 공성 실리콘을 합성하기 위한 식각 용매로는 Hydro fluoric acid (48% by weight: Aldrich Chemicals)와 Ethanol (Aldrich Chemicals)을 3 : 1의 부 피비로 혼합하여 사용하였으며 전류는 Matlab 프로그램을 사용하여 3가지 사인파형의 혼합된 전류를 current power source사용하여 흘려주었다. 전류 의 세기는 126.1 ~ 183.85 mA·cm⁻² 에 0.58, 0.54, 0.50Hz의 혼성된 사인 파형을 500초 동안 흘려주었다. 이 모든 공정은 Teflon cell에서 수행하였 다. 식각 후에는 Ethanol 과 아르곤 가스를 이용하여 세척, 건조하였다.

광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 바이오센서 개발 3-1. 다공성 실리콘의 열적 산화

식각과정을 통해 얻은 다공성 실리콘은 Si-H의 표면을 가지고 있어 공기 중이나 수용액상에서 불안정하다. 그리고 aminoalkyltrimethoxysilane 과 결합 위해 열적 산화반응을 통하여 그 표면이 Si-OH 작용기를 갖는 산화된 다공성 실리콘으로 변형 시킨다. 산화를 시키는 방법으로 furnace (Thermolyne F6270-26 furnace equipped with controller)사용하여 30 0℃에서 3시간 동안 가열하였다.

3-2. 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화

제작된 다공성 실리콘을 바이오센서로 응용하기위해 표면을 감지인식체로 유도하여 바이오 분자를 인식할 수 있도록 한다. 산화된 다공성 실리콘과 3-aminopropyltrimethoxysilane(10 mmol, 99%, Aldrich Chemicals) 1 ml를 넣고 80℃로 12시간동안 가열하여 아민그룹을 갖는 다공성 실리콘 표 면을 제작한다. 가열한 후 ethanol, methylene chloride, acetone 순으로 세 척한 다음 질소가스로 건조시켜 준다. 다음은 생물분자를 인식할 수 있는 감 지인식체로서 biotin을 표면에 고착화시킨다. 고착화 시키는 방법은 N,N-dimethylformamide 를 용매로 사용하고 biotin tetrafluorohenyl ester 100mg를 용해한다. 용해 후 촉매로 triethylamine을 0.9ml를 넣고 30 분간 높은 속도로 교반해 준다. 이렇게 혼합한 용액에 아민그룹을 갖는 다공

성 실리콘을 넣고 실내온도에서 12시간동안 반응 시킨다. 반응 시킨 후 ethanol, methylene chloride, acetone 순으로 세척한 다음 질소가스로 건조 시켜 준다.

3-3. Biotin tetrafluorophenyl ester 의 합성

Biotin (10.22 mmol) 2.5 g을 70°C의 N.N-dimethylformamide 200 mL 에 분위기하에서 용해시킨다. 용해 냉각을 시켜주고 아르곤 후 2.5triethvlamine (20.5)mmol) mL를 주입한 뒤에 2.3.5.6-tetrafluorophenvl trifluoroacetate(15.25 mmol) 4 g를 첨가한다. 반응은 실내온도에서 30분간 시켜주며 용매는 진공상태에서 제거한다. 생성 물은 100mL의 ether에 녹여 여과시켜준다.

3-4. 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide의 합성

2,2'-Bipyridyl disulfide (4.54 mmol) 1 g를 15 mL의 ethanol (99.5%) 에 용해시킨 다음 0.4 mL의 glacial acetic acid를 첨가한다. 혼합된 용매를 높은 속도로 교반하여 주고 5 mL의 ethanol에 0.24 g (2.27 mmol) 의 3-mercaptopropionic acid를 혼합하여 위의 용매에 dropwise 시켜 준다. 두 혼합한 용매는 실내온도에서 12시간동안 반응시켜 준다. 반응 후 용매는 진공상태를 통하여 제거한다. 유질의 생성물은 목표생성물인 pydine-2-thione과 2-2'-dicaboxyl disulfide, 2-pyridy-2-carboxy ethyl disulfide를 포함하고 있다. 잔여물을 제거하고 목표물을 얻기 위해서 silica gel column chromatography를 사용하였다. 유질의 생성물을 컬럼의 표면에 흘려주고 첫 번째 이동상으로 methylene chloride / ethanol 을 (3:2, v/v) 흘려 보내주면 잔여물인 pydine-2-thione은 노란띠를 이루며 밑으로 흘러내려가고 목표 생성물인 2-2'-dicaboxyl disulfide 은 표면에 흡착되어 남아 있다. 표면에 흡착된 목표 생성물을 걸러내기 위해 이동상으로 수 밀 리리터의 acetic acid를 첨가한 methylene chloride / ethanol (10 : 250, v/v)를 흘려보내주어 획득하며 용매는 evaporation을 통해 제거 하면 목표 생성물 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide을 얻는다. 남아있는 소량의

acetic acid 은 높은 진공상태 하에서 제거한다. 수득율은 0.4 g (82.2%, based on 0.24g of the 3-mercaptopropionic acid starting material) 이 다.

3-5. (3-aminopropyl)trimethoxysilane으로 유도화된 다공성 실리콘 과 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide의 표면 유도체화

2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide (0.2 g, 94.7 mmol)를 10 mL 의 녹인 후 용매에 methylene chloride 1-(3-(dimethylamino)propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (100)0.6 mmol)를 첨가한다. 0 용매에 mg, (3-aminopropyl)trimethoxysilane가 유도화된 다공성 실리콘을 첨가하고 12시간동안 실내온도에서 반응시킨다. 반응이 끝난 후 다공성 실리콘의 표면 을 ethanol, methylene chloride, and acetone으로 세척하고 질소 가스로 건조 시켜준다.

4. 바이오 물질의 탐지

Biotin으로 유도화된 다공성 실리콘 칩을 이용하여 바이오 물질을 선택적 으로 탐지하는 연구를 수행하였다. flow cell에 고정된 상태에서 유속은 0.8mL/min 으로 하였으며 바이오 물질로는 streptavidin, avidin을 사용하 였다.

5. 탐지한계 측정

바이오 물질인 Avidin, streptavidin을 흘려주었을 때 변하는 광학적인 신 호를 증폭시키기 위해 두 그래프의 차이 값을 이용한 differential graph를 사용하였다. 바이오 물질의 농도는 최초 20uM이었으며 20nM, 20pM, 2pM 순으로 순차적으로 묽혀 사용하였다.

$\blacksquare.$ Results and Discussion

1. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 합성 결과

Rugate 구조를 갖는 다층 다공성 실리콘은 그 식각 조건이 네모파 형태가 아닌 sine파 형태의 직류전류를 이용하여 식각을 하여 얻을 수 있다. Ruagte 구조의 경우는 다음 식(1)을 이용하여 합성할 수 있다.

$$Y = A \cdot \sin (f * t) + A_{center}$$
(1)

A는 진폭, f는 진동수(Hz), t는 시간, A_{center}는 파형의 중앙값이 된다. 사인파 의 파형과 식각조건을 조절하여 rugate 구조를 갖는 다공성 실리콘을 제작할 수 있는데 rugate 다공성 실리콘의 장점은 사인파를 이용하여 파형에 대한 FFT(퓨리에 변환)하면 다공성 실리콘에서 반사되어 나오는 빛의 상쇄와 보 강간섭으로 인한 반사피크를 미리 예측할 수 있다. 더 나아가 여러 개의 반 사피크들이 원하는 파장들에서 상대적인 세기를 조절할 수 있도록 광학 인코 딩(optical encoding) 할 수 있다. 다중 반사피크를 만들 수 있는 광학 인코 딩은 바코드 기술과 비교할 수 있으며 여러 가지 분석물질들을 단시간에 감 지할 수 있는 multiplex assay 기술로서 이를 다층 다공성 실리콘의 식각기 술에 적용하여 생물분자를 감지하려고 한다. rugate 다공성 실리콘의 경우 Y = A·sin (f*t) + A_{center}의 사인파 공식을 이용한다. 따라서 다중 멀티 신 호를 가진 다공성 실리콘필름 제작을 위해 이 식(1)을 다음과 같이 응용하였 다.

 $Y_i = A_i[1 + sin(f_i * t - B_i)] + A_{i,min}$ (3)

변형된 사인파의 각각의 변수는 A_i는 i번째 rugate의 진폭, f_i는 i번째 rugate의 진동수(Hz), B_i는 사인파의 시작 변위, A_{i,min}는 i번째 rugate진폭 의 최소값이며 따라서 Y_i는 i개의 rugate 다공성 실리콘의 합성파(composite wave)가 된다. 여기서 A_{i,min}과 B_i,을 고정 시키고 f_i를 0.58부터 0.50 Hz까 지 0.04Hz 간격을 갖는 세 개의 사인파를 합성하면 세 개의 반사피크가 인 코딩된 rugate 다공성 실리콘을 얻을 수 있다. Rugate 다공성 실리콘은 때 우 얇은 반치폭 값을 가지고 있다. Figure 10에서 보는 바와 같이 17, 16, 17nm의 반치폭 값을 가지고 있으며 631, 674, 725nm의 특정한 파장에서 반사스펙트럼을 가지고 있다.



Figure 10. Reflectivity of multi-encoded rugate PSi

이렇게 합성된 다중의 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 전자 주사 현미경으로 확인한 결과 Figure 11에서와 같이 표면은 평균 15nm의 기공 크기와 68.4µm의 두께를 가지고 있다.



Figure 11. FE-SEM image of multi-encoded rugate PSi

2. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 바이오센서 개발 결과 2-1. Biotin으로 유도된 rugate 다공성 실리콘 개발 결과

합성된 인코딩된 rugate 다공성 실리콘을 바이오센서로 응용하기 위해 표 면을 화학적으로 유도체화 시키기 위해 Scheme 1과 같이 수행하였다.



공기 중이나 수용액 상에서 불안정한 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화를 통해 OH의 작용기를 갖도록 변화시켰다. 산화 및 유도체화의 여부는 FT-IR을 통해 확인하였다. Figure 12A는 식각된 다공성 실리콘의 FT-IR 스펙트럼이다. 2119와 914cm-1에서 Si-H의 신축 진동과 굽힘 진동을 확 인할 수 있다. 그리고 Figure 12B는 다공성 실리콘의 산화여부를 확인할 수 있다. 식각된 다공성 실리콘을 300℃의 furnace에서 1시간 동안 가열하면 Si-H의 신축 진동 영역인 2085-2150cm⁻¹의 피크가 줄어들게 되고 OSi-H 의 신축 진동과 굽힘 진동이 각각 2200-2250 과 877cm⁻¹에서 나타나는 것 을 확인할 수 있다. 그리고 Si-O-Si의 진동은 1000-1200cm⁻¹에서 강하게 나타난다. 또한 산화된 다공성 실리콘은 굴절율 n이 감소함에 따라 그 유효 광학두께도 변화하게 되는데 첫 번째 포지션을 기준으로 평균 31 nm 이동하 게 된다.



Figure 12. Diffuse reflectance FT-IR spectra of (A) triply encoded rugate PSi, (B) thermally oxidized rugate PSi, (C) the wafer after functionalization of the rugate PSi layer with (3-aminopropyl)trimethoxysilane, and (D) rugate PSi functionalized with biotin.

Si-OH로 표면이 산화된 다공성 실리콘을 Scheme 2과 같이 3-(aminopropyl)trimethoxysilane과 함께 반응 시키면 표면이 아민그룹으로 유도체화 되며 Figure 12C는 치환된 다공성 실리콘의 표면을 FT-IR 스펙 트럼 통해 확인된 결과이다. 아민결합의 신축진동은 3386cm⁻¹에서 굽힘진동 은 1575cm⁻¹에서 피크를 확인할 수 있으며 체인형태의 C-H 신축진동은 2850, 2923, 2952cm⁻¹에서 확인 할 수 있다. 또한 굴절율이 증가하면서 반 사피크도 장파장으로 평균 28 nm 이동하였다. 아민그룹으로 치환된 다공성 실리콘 표면에 avidin, streptavidin 과 반응을 하기 위한 biotin 으로 유도 체화 하기 위해서 biotin tetrafluorophenyl ester를 사용하였다. Biotin tetrafluorophenyl ester를 사용하는 이유는 ester 결합을 위해 Scheme 3에 의해서 합성하였다. 이렇게 합성된 biotin tetraphenyl ester를 Scheme 2에 의해 유도화 하였다. N.N-dimethylformamide 15mL에 합성된 biotin tetraphenyl ester 100mg을 녹이고 촉매로 triethylamine 0.9mL를 넣고 상 온에서 30분간 강하게 혼합하여 준다. 그 후 아민으로 치환된 다공성 실리콘

을 넣고 상온에서 12시간 반응 시킨 후 ethanol, methylene chloride, acetone 순으로 세척한 다음 질소가스로 건조시켜 준다. 그리고 반응된 biotin의 결합의 여부는 Figure 12D에 의해 확인할 수 있었다. biotin의 머 리에 해당하는 C-C 신축진동은 1652cm⁻¹에서 확인하였다. 반사피크 역시 굴절율이 증가함에 따라 평균 15nm 장파장으로 이동하였다.



Scheme 3

2-2. 표면 고정화 작업의 정도 확인

아민 그룹의 표면 고정화 작업의 정도를 확인하기 위해서 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide를 표면에 결합시키고 dithiothreitol(DTT)에 의해 떨어지는 2-thiopyridone의 양을 분석했다. 이 는 Shceme 4에 의해서 실시하였다.



Scheme 4

방출되는 2-thiopyridone의 정량을 UV/vis spectroscopy (λ_{max} = 343nm, ε = 8.08 × 10³ M⁻¹cm⁻¹)를 통해 확인하였다. 126.1-183.85 mA/cm² 전류에 의해 식각된 실리콘 칩의 경우 연결된 분자의 숫자는 대략 30-80%가 표면에 결합한다고 했을 때 그 정량은 300 nmol/cm² 이다. 이를 계산해보면 구멍의 크기는 평균 15nm 이고 다공성도는 81.7%, 식각된 층의 두께는 68.4 μm이며 1.2cm²의 영역에 평균 0.07Å² 간격으로 바이오틴 결합 이 붙어있다.

3. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘을 이용한 단백질의 탐지 결과3-1. rugate 다공성 실리콘을 이용한 단백질의 탐지

이렇게 제작된 다공성 실리콘 바이오센서를 이용하여 생물분자인 avidin, streptavidin과의 분자인식에 대하여 연구를 수행하고 분자에 따라 신호의 차이를 비교하였다. 연구방법은 생물분자가 기질과 결합함으로서 발생하는 굴절률의 변화로 인해 반사피크가 장파장으로 변위를 하게 된다. 이때, 감지 신호를 증폭하는 방법으로 장파장 변위의 차이를 신호로 변형하여 분석하였 다. 유도체화된 다공성 실리콘을 flow cell에 고정시키고 Phospate buffer solution(PBS)을 흘려주며 최초의 반사파장을 측정한다. 다음 cell에 PBS에 각각 avidin과 streptavidin(20uM)을 녹여 0.8mL/min의 속도로 흘려준다. 굴절율 n의 증가로 인해 반사피크는 Figure 13처럼 변화하였다. avidin은 각각의 반사피크가 9, 10, 11nm 장파장으로 이동하였고 streptavidin은 12, 13, 15nm 장파장으로 이동하였다. avidin 보다 streptavidin이 더 많은 이동 폭을 보였다. avidin은 56×50×40 Å, streptavidin은 54×58×48 Å의 크기를 가지고 있다. streptavidin이 avidin보다 더 큰 분자크기를 가지고 있어 굴절 율에 미치는 영향이 커서 조금 더 장파장으로 이동한 것으로 생각된다.



Figure 13. Optical reflection spectra of biotin-fuctionalized rugate PSi sample before (red) and after (blue) exposure of avidin(A) and streptavidin(B), The green line in each case are the difference between spectra obtained in the presence and absence of protein.

3-2. 탐지한계 측정

다음으로 avidin과 streptavidin의 신호 변화를 증폭시키는 방법으로 장파 장 변위의 차이를 신호로 변형하여 미미한 변화 또한 신호를 증폭 시킬 수 있다. Figure 14는 본 연구에서 제작된 다공성 실리콘 바이오센서를 이용하 여 2 pM 농도에 대한 streptavidin이나 avidin의 differential graph 결과이 다.



Figure 14. Plots for showing the detection limits of protein at 2 pM by using differential graph.

3-3. BET 측정 결과

또한 BET식을 이용하여 비표면적을 측정하였다. 산화된 다공성 실리콘의 비표면적은 Table 3에 나타나 있다. 그리고 biotin으로 유도체화된 다공성 실리콘은 그 표면에 biotin으로 유도체화되어 비표면적의 길이가 증가하는 것을 확인할 수 있고 biotin과 streptavidin이 결합하여 그 비표면적이 증가 하였다.

Table 3. surface area of oxidized PSi, biotin-functionalized PSi,Binding streptavidin PSi

Sample	BET
Oxidized PSi	3.1369 m ² /g
biotin-functionalized PSi	3.4477 m ² /g
Binding streptavidin PSi	$3.5605 \text{ m}^2/\text{g}$

IV. Conclusion

Rugate 구조를 갖는 다층 다공성 실리콘은 그 식각 조건이 네모파 형태가 아닌 sine파 형태의 직류전류를 이용하여 식각을 통해 얻었으며 생물분자를 탐지하는 바이오센서로 이용하였다. 합성된 rugate 다공성 실리콘은 매우 얇 은 반치값을 가지며 3개의 특정한 파장에서 반사하는 스펙트럼을 가지고 있 다. 이것은 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘을 바탕으로 avidin과 streptavidin을 탐지하는 중요한 신호이다. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실 리콘의 화학적, 광학적 특성은 FT-IR 스펙트럼을 이용하여 분석하였다. 바 이오틴이 유도화체된 rugate 다공성 실리콘의 광학 신호를 통하여 avidin과 streptavidin을 탐지하는 연구를 수행하였다. Phospate buffer solution에 용해된 avidin과 streptavidin을 흘려 주었을 때 광학 신호는 장파장으로 각 각 9, 10, 11 nm와 12, 13, 15nm 이동하였다. 이는 바이오틴과 단백질의 자 리 결합으로 인하여 굴절율이 증가함으로서 기인된다.

V. References

(1) Diesinger. H.; Bsiesy, A.; Heino, R. *phys. stat. sol.* 2003, 197, 561–565.

(2) Xiao, C.; Boukherroub, R.; Wojtyk, J. C.; Wayner, D. M.; Luong, T.; *Langmuir(Article)* 2002, 8, 4165–4170.

(3) Canham, L. E. EMIS Datareviews, INSPEC: 1997, 18.

(4) Mathew F. P.; E. C. *Alocilja/Biosensors and Bioelectronics.* 2005, 20, 1656–1661.

(5) Guerrero-Lemus, R.; Ben-Hander. F, A.; Fierro; G.; Hernadez-Rodriuez, C.; *Phys. Stat. Sol.* 2003, 197, 137-143.

(6) Dancil, K. S.; Greiner, D. P.; Sailor, M. J. *J. Am. Chem. Soc,* 1999, 121, 7925-7930.

(7) Schmeltzer, J.; Porter, M.; Stewart, M, P.; Buriak, J, M. 2002, 18(8); 2971-2974.

(8) Hamm, D.; Sakka. T.; Ogata Y, H.; Phys. Stat. Sol. 2003, 197,

175-179.

(9) Janshoff, A.; Dancil, K.; Steinem, C.; Greiner, D.; Lin, V. S.; Gurtner, C; Motesharei, K.; Sailor, M, J.; Ghadiri, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 12108–12116.

(10) Buriak, M. Am. Chem. Soc. 2002, 102, 1272-1306.

Chapter 3. Fabrication of DBR Porous Silicon by Asymmetric Electrode Configuration Multiple Template

Park, Jaehyun Advisor : Prof. Sohn, Honglae, Ph.D, Department of Chemistry, Graduate School of Chosun University

Abstract

Porous silicon films displaying a distribution of pore dimensions can be generated by electrochemically etching silicon in aqueous ethanolic HF using an asymmetric electrode configuration. The median pore size and breadth of the size-distribution in the film can be set by adjusting the HF concentration, current density, and position of counter electrode relative to the silicon electrode. Films with pore sizes in the range of a few nanometers are used as size-exclusion matrices to perform an on-chip determination of macromolecule dimensions. Optical reflectivity spectra of the thin porous Si films display distinctive shifts in the Fabry-Perot fringes in regions of the film where the pore dimensions are larger then a critical size, interpreted to be the characteristic dimensions of the protein.

I. Introduction

다공성 실리콘(Porous Silicon, PSi)은 30년 전에 Uhlir와 Turner^[1,2]에 의해서 합성되어 졌고, 1990년대에는 L. T. Canham^[4]에 의해 발광특성이 발견되어 졌다. 단결정 실리콘 웨이퍼에 Hvdrofluoric acid를 용매로 사용하 여 양극으로 일정한 전류를 주게 되면 표면에 수십에서 수백 마이크론 크기 의 기공들이 생겨나게 되며, 이 때 나노크기의 기공들은 흘려주는 전류의 세 기와 형태, 사용하는 용매의 부피비, 실리콘 웨이퍼에 첨가된 불순물의 양에 따라 달라진다^[3]. 이렇게 합성된 다공성 실리콘은 매우 좋은 반사성을 가지고 있어 전자 산업 분야에서 그 응용 가능성이 높은 물질로 인식, 많은 연구가 진행되어지고 있다. 또한, 다공성 실리콘의 독특한 가시광 영역에서 빛을 발 산하는 현상이 발견되면서 발광소자로서의 개발도 활발하게 연구되어 지고 있다^[4-8]. 이러한 광학적 특징을 갖는 다공성 실리콘은 넓은 표면적을 가지고 있으며, 그 표면을 화학적으로의 처리가 용이하다^[9-11]. 또한 기공을 이용한 굴절률의 변화에 따른 광학적 신호를 이용하여 생물학적, 화학적인 센서로서 이용이 가능하며 낮은 가격과 낮은 소비전력, 상온에서 실험이 가능한 이점 을 가지고 있어 많은 관심을 받고 있다^[10-13]. 본 연구에서는 그물형 백금전극 을 이용하여 다층 다공성 실리콘을 제작하는 기존의 대칭 식각방법과는 달리 침형 백금전극을 사용하면 비대칭으로 식각하였다^[14]. 비대칭으로 식각되는 동안 침형 백금전극이 놓인 위치로부터 x 만큼의 거리에 위치한 부분은 거리 에 반비례하여 상대적으로 낮은 전류의 영향을 받아 비대칭으로 식각된다. 무지개 형태의 반사 피크를 갖는 비대칭 다층 다공성 실리콘이 제작할 수 있 다. 그리고 식각면적의 지름을 2 mm² 정도로 작게한 식각 모형 틀을 이용하 여 비대칭으로 식각하여 각각의 식각된 영역이 2차원으로 서로 다른 반사피 크들을 갖는 on-chip multi-encoded 다공성 실리콘을 제작하였다.

$\ensuremath{\Pi}$. Experimental Section

1. Materials & Instrument.

1-1. Materials

비대칭 전극을 이용한 다공성 실리콘을 합성하기 위해 0.8-0.2mΩcm의 저항 값을 갖는 p⁺⁺-type의 실리콘 웨이퍼를 사용하였다. 전기화학적 부식을 시키기 위한 부식용매는 hydrofluoric acid (ACS reagent, Aldrich)와 순수 한 ethanol (ACS reagent, Aldrich)의 혼합용액을 사용하였다. 부식시키기 위한 Etching cell은 Teflon cell을 사용하였고, 식각 틀은 teflon을 이용하 여 제작하였다. +전극에는 platinum wire로 -전극에는 aluminum foil을 사 용하였다.

1-2. Instrument

실리콘 웨이퍼에 전기화학적으로 부식(Electrochemical Etching)을 시키 기 위해 Galvanostat(soucemeter2420)을 이용하였다. 합성된 다공성 실리 콘은 UV-VIS integrated analysing system (Ocean Optics USB-2000 spectrometer)을 사용하여 샘플의 reflectivity를 측정하였다. 식각된 표면을 측정하기 위해 전자주사 현미경(FE-SEM)을 사용하였다.

2. 비대칭 식각기술에 의해 광한 인코딩된 다공성 실리콘의 개요

그물형 백금전극을 이용하여 다층 다공성 실리콘을 제작하는 기존의 대칭 식각방법과는 달리 침형 백금전극을 사용하면 비대칭으로 식각이 된다. Figure 15은 비대칭 식각방법을 도식화한 것으로 식각되는 동안 침형 백금 전극이 놓인 위치로부터 x 만큼의 거리에 위치한 부분은 거리에 반비례하여 상대적으로 낮은 전류의 영향을 받아 비대칭으로 식각이 되어 무지개 형태의 반사 피크를 갖는 비대칭 다층 다공성 실리콘을 제작할 수 있다. 그리고 식 각면적의 지름을 Figure 15와 같이 2 mm² 정도로 작게한 식각 모형 틀을 이용하여 비대칭 식각을 하면 각각의 식각된 영역이 2차원으로 서로 다른 반 사피크들을 갖는 on-chip multi-encoded 다공성 실리콘을 제작할 수 있다.



Position of Pt electrode

Figure 15. Schematic diagram of the synthesis of multi-arrayed PSi.

3. 비대칭 식각기술에 의해 광한 인코딩된 다공성 실리콘의 합성 3-1. Multi-arrayed DBR 다공성 실리콘의 합성

위에서 설명한 비대칭 식각방법을 이용해 사각파를 적용한 DBR 다공성 실리콘의 합성 방법은 식각면적의 지름을 2 mm² 정도로 작게 한 식각 모형 틀을 teflon으로 제작하고 침형 백금전극을 이용하여 비대칭으로 저항 값이 작은 p⁺⁺- type의 실리콘 웨이퍼에 Galvanostat을 통하여 전류를 흘려준다. 식각 용매로는 Hydro fluoric acid 와 Ethanol 을 3 : 1의 부피비로 혼합하 여 사용하였으며 낮은 전류는 10 mA·mm⁻² 에 11초, 높은 전류는 100 mA·mm⁻² 에 1.5초 동안 흘려주었으며 30번 반복하였다. 이 모든 공정은 Teflon cell에서 수행하였다. 식각 후에는 Ethanol 과 아르곤 가스를 이용하 여 세척, 건조하였다.

3-2. 4inch 실리콘 웨이퍼를 이용한 비대칭 다공성 실리콘의 합성

2×2cm²에 지름이 2mm인 9개의 식각된 영역을 확대하여 4 inch에 보다 많은 식각 영역을 만들어 주어 미지의 특정한 물질을 선택적으로 한 번에 탐 지해 내기 위한 바이어 센서 칩을 제작하였다. 4 inch의 p⁺⁺- type의 실리콘 웨이퍼을 사용하여 지름이 6 mm, 2 mm 인 식각 틀을 제작하고 teflon cell

에 고정한 후 Galvanostat을 통해 1시간 동안 100 mA·mm⁻² 의 전류를 침 형 백금전극을 이용하여 비대칭으로 흘려 주었다. 또한 4 inck의 n-type 실 리콘 웨이퍼를 이용하여 지름이 2 mm 인 식각 틀을 제작하여 teflon cell에 고정 후 300W 백열등을 비춰 주면서 300 mA·mm⁻² 전류를 흘려 주었다. 식각 용매 Hydro fluoric acid 와 Ethanol 을 1 : 1의 부피비로 혼합하여 사용하였다. 식각 후에는 Ethanol과 아르곤 가스를 이용하여 세척, 건조하였 다.

III. Results and Discussion

비대칭 식각기술에 의해 광한 인코딩된 다공성 실리콘의 합성 결과 1-1. Multi-arrayed DBR 다공성 실리콘의 합성 결과

그물형 백금전극을 이용하여 다층 다공성 실리콘을 제작하면 1.2cm²의 식 각면적 안에 고른 전류가 전달되어 같은 반사 파장을 갖는 다공성 실리콘이 합성되게 된다. 하지만 기존의 식각방법과는 달리 침형 백금전극을 사용하면 전극을 중심으로 비대칭으로 식각이 된다. 침형 백금전극을 어느 한 점에 놓 고 식각을 하게 되면 그 점을 중심으로 전류가 전달되는데 위치로부터 x 만 큼의 거리에 위치한 부분은 거리에 반비례하여 상대적으로 낮은 전류의 영향 을 받아 비대칭으로 식각이 되어 무지개 형태의 반사 피크를 갖는 비대칭 다 층 다공성 실리콘을 제작되게 된다. 또한 식각틀을 사용하게 되면 구멍이 뚫 린 부분만 식각용매가 전달되어 그 부분만 식각이 되며 식각된 부분은 서로 다른 광학적 정보를 가지게 된다. Figure 16는 식각된 mulit-arrayed DBR 다공성 실리콘의 사진과 반사스팩트럼을 나타낸다.



Figure 16. Reflectivity and photography of multi-arrayed PSi.

식각된 DBR 다공성 실리콘의 Figure 16의 반사 스펙트럼에서 볼 수 있듯

이 9개 면적에서 서로 다른 광학 정보를 같는 multi-arrayed 다공성 실리콘 을 합성할 수 있었다. 백금 전극의 영향을 가장 많이 받은 1번 지점의 파장 이 가장 장파장에 있으며 가장 적게 받은 9번 지점의 파장은 전류의 영향으 로 인해 단파장에 위치하는 것을 알 수 있다. Figure 17은 식각한 multi-arrayed DBR 다공성 실리콘의 거리에 따른 관계를 정리한 것이다.



Figure 17. Shift of wavelength by distance.

Figure 17에서 보는 바와 같이 백금 전극에서 거리가 멀어짐에 따라 단파 장으로 선형에 가깝게 이동하는 것을 알 수 있다. 또한 FE-SEM 사진을 통 해서도 백금 위치에 따른 전류의 영향 정도를 확인할 수 있다(Figure 18).



Figure 18. FE-SEM image of multi-arrayed DBR PSi.

백금의 위치와 가까운 첫 번째 자리는 많은 전류의 영향을 받아 pore의 크기 가 큰 것을 멀어질수록 작아지는 것을 확인할 수 있다. 이 pore들의 크기는 전류의 세기등의 파라미터를 변화시켜 조절가능하다.

1-2. 4 inch 실리콘 웨이퍼를 이용한 다공성 실리콘의 합성 결과

2×2cm²에 지름이 2mm인 9개의 식각된 영역을 확대하여 4inch에 보다 많 은 식각 영역을 만들어 주어 미지의 특정한 물질을 선택적으로 한 번에 탐지 해 내기 위한 바이어 센서 칩을 개발하였다. Figure 19은 지름을 다르게 하 여 합성한 비대칭 식각으로 광학 인코딩된 다공성 실리콘의 사진이다. Figure 19A는 지름을 6mm로 하여 4inch 의 크기에 51개의 영역을 식각한 것이고 Figure 19B는 지름을 2mm하여 294개의 영역을 만들어 준 것이다. 또한 각각의 영역들은 서로 다른 광학 신호를 가지고 있다.



Figure 19. Photography and reflective spectra 4inch PSi.

Figure 20과 같이 광 반사성을 갖는 p-type 실리콘 웨이퍼가 아닌 광 발 광성의 특징을 가지는 n-type 실리콘을 이용하여 제작된 다공성 실리콘의

사진이다. 지름을 2mm로 제작한 teflon 틀을 제작하여 300W 백열등을 비 쳐주면서 전기화학적 부식한 결과 식각된 부분만 UV-Lamp 하에서 570nm 영역에서 발광하는 것을 확인할 수 있다.



Figure 20. Photoluminescence and photogrphy of n-type PSi.

이렇게 식각된 multi-arrayed 다공성 실리콘은 각각의 영역들은 서로 다 른 광학 신호를 가지고 있기 때문에 각각의 식각된 영역에 여러 가지의 항체 와 결합할 수 있는 항원을 연결하여 준다면 선택적이고 간편한 다중검지 바 이오센서를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

IV. Conclusion

식각면적의 지름을 2 mm² 정도로 작게 한 식각 모형 틀을 제작하여 침형 백금전극을 이용하여 사각파의 전류를 흘려주어서 비대칭으로 식각된 무지개 형태의 반사 피크를 갖는 비대칭 DBR 다공성 실리콘을 제작하였다. 이렇게 합성된 다공성 실리콘은 9개의 면적에서 서로 다른 광학 정보를 같는다. multi-arrayed 다공성 실리콘의 반사피크는 거리에 따라 선형으로 단파장으 로 이동하는 것을 확인하였고 전자 주사 현미경을 통해 백금의 위치와 가까 운 첫 번째 자리는 많은 전류의 영향을 받아 pore의 크기가 큰 것을 멀어질 수록 작아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 2×2cm²에 지름이 2mm인 9개 의 식각된 영역을 확대하여 4inch에 보다 많은 식각 영역을 만들어 주어 미 지의 특정한 물질을 선택적으로 한 번에 탐지해 내기 위한 바이어 센서 칩을 개발하였다. 지름을 6mm로 하여 4inch 의 크기에 51개의 영역과 지름을 2mm하여 294개의 영역을 만들어 주었다. 또한 각각의 영역들은 서로 다른 광학 신호를 가지고 있다. 광 반사성의 특성을 갖는 p-tvpe 실리콘 웨이퍼가 아닌 광 발광성의 특징을 가지는 n-type 실리콘을 이용하여 지름을 2mm로 제작한 teflon 틀을 제작하여 300W 백열등을 비쳐주면서 전기화학적 부식된 결과 UV-Lamp 하에서 570nm 에서 발광하는 것을 확인하였다. 이렇게 식 각된 multi-arraved 다공성 실리콘은 각각의 영역들은 서로 다른 광학 신호 를 가지고 있기 때문에 각각의 식각된 영역에 여러 가지의 항체와 결합할 수 있는 항원을 연결하여 준다면 선택적이고 간편한 다중검지 바이오센서를 개 발할 수 있을 것으로 기대된다.

V. References

[1] A.Uhlir. "Electrolytic shaping of germanium and silicon." *Bell syst. Tech. J.*, **35**. 333 (1956).

[2] D. R. Turner. "Electropholishing silicon in hydrofluoric acid solution." *J. Electochem. Soc.*, **105**, 402 (1958).

[3] M.I.J Beale, N.G. Chew, M.J. Uren, A.G. Cullis, and J.D. Benjamin, "Microstructure and formation mechanism of porous

silicon." Appl. phys. Lett., 46(1), 86 (1985).

[4] L.T. Canham, "Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers," *Appl. Phys. Lett.*, **57**(10), 1046 (1990).

[5] A.G. Cullis and L.T. Canham, "Visible light emission due to quantum size effects in highly porous crystal-line silicon," *nature*, 353, 335 (1991)

[6] C. Tsai, K.H. Li, D.s. kinosky, R.Z. Qian, T.C. Hsu, J.T. Irby, S.K. Banerjee, A.F. Tasch, J.C. Campbell, B.K. Hance, and J.M. White, "Correlation between silicon hydride species and the photoluminescence intensity of porous silcon," *Appl. Phys. Lett*, **60**(14), 1700(1992).

[7] C. Tsai, K.H. Li, J. Sarathy, S. Shih, J.C. Cambell, B.K. Hance, and J.M. White, "thermal treatment studies of the photoluminescence spectra of porous silicon boiled in water," *J. Appl. Phys.* **72**(8), 3816 (1992).

[8] K.H. Li, C. Tsai, S. Shih, T. Hsu, D.L. kwong, and J.C. Campbell, "The photoluminescence spectra of porous silicon boiled in water," *J. Appl. Phys*, **72**(8), 3816 (1992).

[9] R. Herino, "Properties of Porous Silicon", Short Run Press, London, pp.89, 1997.

[10] V. S. - Y. Lin, K. Motesharei, K. - P. S. Dancil, M. J. Sailor,
M. R. Ghadiri, "A porous silicon-based optical interferometric biosensor", *Science*, vol. 278, pp. 840–843, 1997.

[11] A. Janshoff, K. - P. S. Dancil, C. Steinem, D. P. Greiner, V. S. - Y. Lin, C. Gurtner, K. Motesharei, M. J. Sailor, M. R. Ghadiri, "Macroporous p-type silicon Fabry-Perot layers. Fabrication, characterization, and applications in biosensing", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, pp. 12108-12116, 1998.

[12] K. - P. S. Dancil, D. P. Greiner, M. J. Sailor, "A porous silicon optical biosensor: Detection of reversible binding of IgG to a protein A-modified surface", *J. Am. Chem. Soc.* vol. 121, pp. 7925-7930, 1999.

[13] G. Garcia Salgado, T. Diaz Becerril, H. Juarez Santiesteban, andE. Rosendo Andres, "Porous silicon organic vapor sensor." optmat.29, 51, (2006).

[14] B. E. Collins, K. -P. S. Dancil, A. Gaurav, and M. J. Sailor, Adv. Funct. Mater. 12, **3**, (2002).

Chapter 4. Porous Silicon Nanobiosensor for Detection of Immunoprotein

Park, Jaehyun Advisor : Prof. Sohn, Honglae, Ph.D, Department of Chemistry, Graduate School of Chosun University

Abstract

Asymmetric porous silicon-based optical biosensor was developed to specify the biomolecules. Asymmetric porous silicon was generated by an electrochemical etching of silicon wafer using an asymmetric electrode configuration in aqueous ethanolic HF solution. Asymmetric porous silicon prepared by using anisotropic etching conditions displayed Fabry-Perot fringe patterns whose reflection maxima varied spatially across the porous silicon. The sensor system studied consisted of monolayer porous silicon modified with biotin. When the biotin-derivatized asymmetric porous silicon was exposed to avidin in PBS buffer solution, molecular binding caused an increase of its effective optical thickness. The changes of effective optical thickness at different positions of asymmetric porous silicon were measured to specify the biomolecules.

I. Introduction

실리콘 기반의 전자 산업이 발달하면서 실리콘을 발광 소자로 이용하려는 연구가 활발히 진행중이다. 잘 알려진 바와 같이 일반적인 실리콘은 간접전 이형 물질로 매우 낮은 양자효율(10-2~10-3 %)을 가지고 있으며 에너지 밴드갭이 1.12 eV로 적외선 광소자 개발에 제약이 큰 물질이다^[1]. 1950년대 에 Uhlir와 Turner^[2]에 의해 HF 수용액 속에서 실리콘의 전해연마 (electropolishing)도중 발견된 다공성 실리콘(porous silicon)은 전자 절연기 술에 이용되었는데, 최근에 Canham^[3]이 p-형 실리콘 기판을 양극반응 (anodization)시켜 실리콘 기판의 표면에 수 um의 두께에 달하는 다공성 실 리콘을 형성시킨 후, Ar 레이저(laser)를 조사하여 가시광선 영역인 500~ 800 nm의 파장범위에서 발광(photoluminesence; PL)현상을 관찰한 이후 이 를 광소자로 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행되어 왔다^[4]. 다공성 실리 콘은 화학적 전기화학적 식각에 의해서 얻어질 수 있으며, etching용액의 농 도 및 실리콘의 doping종류와 anodic etching시의 인가전류에 따라 pore size에 의해 macro porous, mesoporous, nanoporouse 등의 구조^[5]를 가지 며, 일정한 조건하에서는 일정한 형태의 다공성 실리콘이 형성되는 것으로 알려져 있다. 다공성층의 thickness에 관해서는 etching시간이 주요 변수로 알려져 있으나^[6] etching시 얼마간의 시간동안 porous층의 깊이는 일정하게 유지되면서 기둥의 두께가 얇아지는 과정이 존재한다는(self confinment process) 연구 또한 보고된바 있다. 다공성 실리콘은 enzymes, DNA fragments, antibodies 와 같은 다양한 biomolecules 가 고정될 수 있는 넓 은 내부면적을 가지고 있으며 일반적으로 1cm² 표면당 수백 cm²에 이르는 내부 면적을 가지는 것으로 알려져 있다^[7]. 또한 최근에 다공성 실리콘의 전 자학, 광학 성질이 biomolecule간의 상호작용의 tranducer와 그에 부응하여 바이오센서로의 응용이 될수 있다고 보고되었다^[8]. 저렴하고 쉽게 이용할 수 있는 다공성 실리콘의 평평하고 얇은 막을 기초로 한 광학 간섭 변환기 (transducer) 기구는 DNA oligonucleotides, proteins과 같은 작은 분자들 의 검출에 매우 높은 민감성을 가지고 있다. Fabry-Perot fringe 패턴은 공 기-다공성 실리콘층과 다공성 실리콘-벌크 실리콘 경계면에 백색광으로 조

명된 복합 반사에 의해 형성된다^[9]. Fabry-Perot fringe 패턴에서 일어나는 변화는 biomolecule을 검출하기 위해서 감도가 높은 방법으로 사용될 수 있 는 다공성 실리콘 매트릭스내에 검출대상물질을 고정시킬 수 있는 recognition group과 검출물질간의 binding에 의한 굴절율 변화에 의해서 일어난다^[10].

본 연구에서는 식각면적의 지름을 2 mm² 정도로 작게 한 식각 모형 틀을 이용하여 비대칭으로 식각하여 각각의 식각된 영역이 2차원으로 서로 다른 반사피크들을 갖는 on-chip multi-encoded 다공성 실리콘을 제작하고 광학 적 간섭변화에 따른 굴절률 특성을 조사하여 다공성 실리콘의 구조 변화를 조사하였다. 또한 반사 간섭 스펙트럼은 다공성 실리콘의 구조에서 굴절율에 아주 민감하므로 기공 내에 고정된 인식그룹과 검출물질의 상호작용은 나노 결정의 반도체의 굴절율 변화를 야기 시키고 fringe 패턴의 이동이 일어나는 데 이것은 쉽게 CCD(charge-coupled device) detector에 쉽게 감지되고 정 량화된다. 물질을 선택적으로 검출하기 위해서는 그 물질을 바이딩 할 수 있 는 인식그룹을 다공성 실리콘에 화학적으로 고정을 시킨후 바인딩 된 후의 굴절율의 변화로 fabry-perot fringe의 이동상태로 effective optical thickness를 구하여 검출물질의 탐지하였다. 따라서 현재 이를 이용한 biosensor 연구를 위하여 biontin과, 이를 바이딩 시킬 수 있는 고정 물질로 이와 결합력이 뛰어난 streptavidin, biotinlyted protein A 그리고 면역 화 학 검사 시 면역성 질환, 만성 감염증, malabsorption syndrome의 원인이 되는 항체 IgG를 탐지하는 센서로서의 기능의 연구를 수행하였다.

${\rm I\hspace{-1.4mm}I}$. Experimental Section

1. Materials & Instrument.

1-1. Materials

광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘을 합성하기 위해 0.08~0.12 mΩ 의 저항 값을 갖는 p⁺⁺-type 실리콘 웨이퍼를 사용하였다. 전기화학적 부식을 시키기 위한 부식용매는 hydrofluoric acid (ACS reagent, Aldrich) 와 순 수한 ethanol (ACS reagent, Aldrich)의 혼합용액을 사용하였다. 부식시키 기 위한 Etching cell은 Teflon cell을 사용하였고, +전극에는 platinum wire로 -전극에는 aluminum foil을 사용하였다. 바이오센서로 개발하기 위 해 3-aminopropyltrimethoxysilane, avidin, streptavidin (Aldrich Chemicals)을 구입하여 사용하였으며 아민과 결합할 biotin tetrafluorophenyl ester 을 합성하기 위해 triethylamine, 2,3,5,6-tetra fluorophenyl trifluoroacetate, Biotin (Aldrich Chemicals)을 구입하여 사 용하였다. 또한 표면 유도체화 정도를 확인할 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide을 합성하기 위해 2,2'-Bipyridyl disulfide, 3-mercaptopropionic acid, silica gel column chromatography (Aldrich Chemicals)을 구입하 여 사용하였다. 분석물질로 streptavidin, biotinylated-protein A, human IgG (Sigma)에서 구입하여 사용하였다.

1-2. Instrument

FT-IR 스펙트라는 diffuse reflectance (Spectra-Tech diffuse reflectance attachment)방식을 이용하여 Nicolet model 5700을 이용 하여 측정 하였다. 광학 인코딩된 rugate 다공성 실리콘의 구조 형태는 SEM (FE-SEM, S-4700, Hitach)를 이용하여 측정하였다. 2-Thiopyridone의 방 출정도는 UV-vis spectrometer (UV-2401 PC, Shimazu)를 이용하여 측정 하였다. 표면 유된 rugate 다공성 실리콘 에서부터 2-thiopyridone의 방출 정도의 양의 결정은 흡수과장을 343 mm의 파장을 고정하여 측정을 하였다.

2. Template를 이용한 multi-arrayed 다공성 실리콘의 합성

비대칭 식각방법을 이용한 다공성 실리콘의 합성 방법은 순수한 p⁺⁺- type

의 실리콘 웨이퍼를 침형 백금전극을 이용하여 비대칭으로 Galvanostat 을 통하여 전류를 흘려주면 전기화학적 식각과정을 거쳐 합성된다. 식각면적의 지름을 2 mm² 정도로 작게한 식각 모형 틀을 이용하여 비대칭 식각을 하면 각각의 식각된 영역이 2차원으로 서로 다른 반사피크들을 갖는 on-chip multi-encoded 다공성 실리콘이 제작된다. 식각 용매로는 Hydro fluoric acid와 Ethanol을 3 : 1의 부피비로 혼합하여 사용하였으며 전류는 단위 면 적당 전류가 6배 세어진다는 것을 감안하여 기존 조건의 1/6배 만큼 가해 준 40 mA·mm⁻² 에 20초 동안 흘려주었다.



Figure 21. Schematic diagram of the synthesis of multi-arrayed PSi.

3. 바이오칩으로의 개발

3-1. 다공성 실리콘의 열적 산화

식각과정을 통해 얻은 다공성 실리콘은 Si-H의 표면을 가지고 있어 공기 중 이나 수용액상에서 불안정하다. 그리고 aminoalkyltrimethoxysilane 과 결 합 위해 열적 산화반응을 통하여 그 표면이 Si-OH 작용기를 갖는 산화된 다공성 실리콘으로 변형 시킨다. 산화를 시키는 방법으로 furnace (Thermolyne F6270-26 furnace equipped with controller)을 사용하여 300℃에서 1시간 동안 가열하였다.

3-2. 산화된 다공성 실리콘 표면의 유도체화

제작된 다공성 실리콘을 바이오센서로 응용하기위해 표면을 감지인식체로 유도하여 바이오 분자를 인식할 수 있도록 한다. 산화된 다공성 실리콘과 3-aminopropyltrimethoxysilane(10 mmol, 99%, Aldrich Chemicals) 1 ml를 넣고 80℃로 12시간동안 가열하여 아민그룹을 갖는 다공성 실리콘 표 면을 제작한다. 가열한 후 ethanol, methylene chloride, acetone 순으로 세 척한 다음 질소가스로 건조시켜 준다. 다음은 생물분자를 인식할 수 있는 감 지인식체로서 biotin을 표면에 고착화시킨다. 고착화 시키는 방법은 N,N-dimethylformamide 를 용매로 사용하고 biotin tetrafluorohenyl ester 100mg를 용해한다. 용해 후 촉매로 triethvlamine을 0.9ml를 넣고 30 분간 높은 속도로 교반해 준다. 이렇게 혼합한 용액에 아민그룹을 갖는 다공 성 실리콘을 넣고 실내온도에서 12시간동안 반응 시킨다. 반응 시킨 후 ethanol, methylene chloride, acetone 순으로 세척한 다음 질소가스로 건조 시켜 준다. Teflon으로 제작된 flow cell에 바이오틴이 유도화된 다공성 실 리콘을 고정하고 Phospate buffer solution에 용해된 20uM 농도의 streptavidin을 흘려준다. 그 후 광학적 신호 변환을 확인하고 순수한 phospate buffer solution을 흘려 세척한 다음 streptavidin의 빈자리와 결 phospate buffer solution에 용해된 biotinlated protein A(20µM)를 합할 흘려준다. 광학적 신호 변환을 확인하고 순수한 phospate buffer solution을 흘려 세척한다.

3-3. 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide의 합성

2,2'-Bipyridyl disulfide (4.54 mmol) 1 g를 15 mL의 ethanol (99.5%)에 용해시킨 다음 0.4 mL의 glacial acetic acid를 첨가한다. 혼합된 용매를 높은 속도로 교반하여 주고 5 mL의 ethanol에 0.24 g (2.27 mmol) 의 3-mercaptopropionic acid를 혼합하여 위의 용매에 dropwise 시켜 준다. 두 혼합한 용매는 실내온도에서 12시간동안 반응시켜 준다. 반응 후 용매는 진공상태를 통하여 제거한다. 유질의 생성물은 목표생성물인 pydine-2-thione과 2-2'-dicaboxyl disulfide, 2-pyridy-2-carboxy ethyl disulfide를 포함하고 있다. 잔여물을 제거하고 목표물을 얻기 위해서 silica

gel column chromatography를 사용하였다. 유질의 생성물을 컬럼의 표면에 흘려주고 첫 번째 이동상으로 methylene chloride / ethanol 을 (3:2, v/v) 흘려 보내주면 잔여물인 pydine-2-thione은 노란띠를 이루며 밑으로 흘러내려가고 목표 생성물인 2-2'-dicaboxyl disulfide 은 표면에 흡착되어 남아 있다. 표면에 흡착된 목표 생성물을 걸러내기 위해 이동상으로 수 밀리리터의 acetic acid를 첨가한 methylene chloride / ethanol (10:250, v/v)를 흘려보내주어 획득하며 용매는 evaporation을 통해 제거 하면 목표생성물 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide을 얻는다. 남아있는 소량의 acetic acid 은 높은 진공상태 하에서 제거한다. 수득율은 0.4 g (82.2%, based on 0.24g of the 3-mercaptopropionic acid starting material) 이다.

3-3. (3-aminopropyl)trimethoxysilane으로 유도화된 다공성 실리콘 과 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide의 표면 유도체화

2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide (0.2 g, 94.7 mmol)를 10 mL 의 methylene chloride 용매에 녹인 후 1-(3-(dimethylamino)propyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (100 mg, 0.6 mmol)를 첨가 한다. 이 용매에 (3-aminopropyl)trimethoxysilane가 유도화된 다공성 실리 콘을 첨가하고 12시간동안 실내온도에서 반응시킨다. 반응이 끝난 후 다공성 실리콘의 표면을 ethanol, methylene chloride, and acetone으로 세척하고 질소 가스로 건조 시켜준다.

4. FT 변환에 의한 중폭

다공성 실리콘은 실리콘 단결정 웨이퍼에 정전류를 흘려주어 전기화학적으 로 부식하여 만든다. 합성된 다공성 실리콘은 백색광원을 이용해 반사스펙트 럼을 측정하면 다공성 실리콘 층으로 인하여 반사된 파장들이 보강 또는 상 쇄 간섭을 하여 Fabry-Perot fringe patten을 이룬다. 단층 다공성 실리콘 의 광학적 특성은 Bragg식에 의해 반사광의 간섭현상을 규명할 수 있다. 다 공성 실리콘의 구조는 굴절률(reflective index)이 n이고, 층의 두께 (thickness)가 L일 때, 두 값의 상호작용으로 식(1)을 만족시킬 때 단층 다 공성 실리콘으로서 작용한다.

$$m\lambda = 2nL \sin \theta \tag{1}$$

이때 θ가 90°이므로 sinθ 는 1이다. 그러므로 반사파장은 n과 L에 의해서 달라진다. 다공성 실리콘이 센서로서 작용할 때 두께 L은 고정되어 있으므로 반사파장은 굴절율인 n에 의해서 결정된다. 또한 전해질의 HF 농도와 흘려 주는 전류의 양을 조절하면 원하는 굴절률을 갖는 다층 다공성 실리콘을 만 들 수 있고, 부식 시간은 층의 원하는 두께를 만들 수 있다. 그러므로 광학두 께는 nL=mλ/2 로 나타낼 수 있다. 이 식을 해석하면 보강간섭으로 인해 m 번째 증폭하는 반사피크의 파장을 반으로 나눈 값이 광학두께이다. 따라서 실험적으로 n과 L을 구하면 다층다공성 실리콘의 광학두께를 알 수 있으며 생물분자의 결합으로 인해 전체 다공성 실리콘의 굴절률은 소폭 변하게 된 다. 예를 들어 p타입 다공성 실리콘의 경우 다공성이 0-100%까지 변할 때 굴절률의 변화는 3.4-1.0이다. 이 굴절률의 변화(Δn)는 Δλ를 m배 만큼 증폭 시킨다. 이를 프로그래밍하고 igor를 사용하여 광학유효두께(EOT : effective optical thickness)를 측정할 수 있었다.

5. 바이오 물질의 탐지

biotin으로 유도화된 다공성 실리콘 칩을 이용하여 바이오 물질들을 선택 적으로 탐지하고 면역 화학 검사 시 면역성 질환, 만성 감염증, malabsorption syndrome의 원인이 되는 항체 IgG를 탐지하는 센서로서의 기능의 연구를 수행하였다. flow cell에 고정된 상태에서 유속은 0.8mL/min 으로 하였으며 바이오 물질로는 streptavidin, biotinylated-protein A, human IgG를 순차적으로 흘려 사용하였다.

III. Results and Discussion

1. Multi arrayed 다공성 실리콘의 파장 측정 결과

침형 백금전극을 사용하여 비대칭으로 전류를 흘려주었고 식각면적의 지름 을 2 mm² 정도로 작게한 식각 모형 틀을 이용하여 각각의 식각된 영역이 2 차원으로 서로 다른 반사피크들을 갖는 on-chip multi-encoded 다공성 실 리콘을 제작하였다. Figure 22은 비대칭 식각에 의해 광학 인코딩된 다공성 실리콘의 합성 방법과 합성된 사진을 나타낸 것이다.



Figure 22. Schematic diagram and photography of the synthesis of multi-arrayed PSi.

이와 같은 방법으로 식각을 하게 되면 백금전극이 놓인 위치로부터 x 만큼 의 거리에 위치한 부분은 거리에 반비례하여 상대적으로 낮은 전류의 영향을 받아 비대칭으로 식각이 된다. 다음 Figure 23는 다공성 실리콘의 표면의 SEM을 측정한 것이다. 백금의 위치와 가까운 첫 번째 자리는 많은 전류의 영향을 받아 다공성도가 큰 것을 멀어질수록 작아지는 것을 확인할 수 있다.



Figure 23. FE-SEM image of multi-arrayed PSi.

또한 이렇게 합성된 다공성 실리콘은 식각된 영역이 2차원으로 서로 다른 반 사피크들을 가지며 Figure 24(A)와 같이 Fabry-Perot fringe patten을 나 타내며 이를 퓨리에 변화를 통해 유효광학두께를 구할 수 있다. 유효광학두 께는 nL=m\/2 로 나타낼 수 있는데 이 식을 해석하면 보강간섭으로 인해 m번째 증폭하는 반사피크의 파장을 반으로 나눈 값이 광학두께이다. 따라서 실험적으로 n과 L을 구하면 다층다공성 실리콘의 광학두께를 알 수 있으며 이를 프로그래밍하고 igor 4.0을 사용하여 Figure 24(B)처럼 광학유효두께 를 측정할 수 있었다.



Figure 24. Reflective spectra and effective optical thickness of multi-arrayed PSi.

2. Multi arrayed 다공성 실리콘의 바이오센서 제작 결과

2-1. Multi arrayed 다공성 실리콘의 유도체화

합성된 비대칭 식각에 의해 광학 인코딩된 다공성 실리콘을 화학적으로 유도 체화 시키기 위해 Scheme 5와 같이 수행하였다.



공기 중이나 수용액 상에서 불안정한 다공성 실리콘의 표면을 열적 산화를
통해 OH의 작용기를 갖도록 변화시켰다. 산화 및 유도체화의 여부는 FT-IR을 통해 확인하였다. multi-arrayed 다공성 실리콘의 식각면적이 작 아 FT-IR 스펙트럼으로 확인할 수 없어 p-type 실리콘을 식각하여 대신 수 행하였다. Figure 25A는 식각된 다공성 실리콘의 FT-IR 스펙트럼이다. 2119와 914cm-1에서 Si-H의 신축 진동과 굽힘 진동을 확인할 수 있다. 그리고 Figure 25B는 다공성 실리콘의 산화여부를 확인할 수 있다. 식각된 다공성 실리콘을 300℃의 furnace에서 1시간 동안 가열하면 Si-H의 신축 진동 영역인 2085-2150cm⁻¹의 피크가 줄어들게 되고 OSi-H의 신축 진동과 굽힘 진동이 각각 2200-2250 과 877cm⁻¹에서 나타나는 것을 확인할 수 있 다. 그리고 Si-O-Si의 진동은 1000-1200cm⁻¹에서 강하게 나타난다. 또한 산화된 다공성 실리콘은 식(1)에서 나타낸 n이 감소함에 따라 그 유효광학두 께도 변화하게 되는데 첫 번째 포지션을 기준으로 평균 185nm 이동하게 된 다.



Figure 25. Diffuse reflectance FT-IR spectra of (A) triply encoded rugate PSi, (B) thermally oxidized rugate PSi, (C) the wafer after

functionalization of the rugate PSi layer with (3-aminopropyl)trimethoxysilane, and (D) rugate PSi functionalized with biotin.

표면이 산화된 다공성 실리콘을 Scheme Si-OH로 5과 같이 3-(aminopropyl)trimethoxysilane과 함께 반응 시키면 표면이 아민그룹으로 유도체화 되며 Figure 25C는 치환된 다공성 실리콘의 표면을 FT-IR 스펙 트럼 통해 확인된 결과이다. 아민결합의 신축진동은 3386cm⁻¹에서 굽힘진동 은 1575cm⁻¹에서 피크를 확인할 수 있으며 체인형태의 C-H 신축진동은 2850, 2923, 2952cm⁻¹에서 확인 할 수 있다. 아민그룹으로 치환된 다공성 실리콘 표면에 streptavidin 과 반응을 하기 위한 biotin 으로 유도체화 하기 위해서 biotin tetrafluorophenyl ester를 사용하였다. Biotin tetrafluorophenyl ester를 사용하는 이유는 ester 결합을 위해 Scheme 6에 의해서 합성하였다. 이렇게 합성된 biotin tetraphenvl ester를 Scheme 5에 의해 유도화 하였다. N.N-dimethylformamide 15mL에 합성된 biotin tetraphenvl ester 100mg을 녹이고 촉매로 triethvlamine 0.9mL를 넣고 상 온에서 30분간 강하게 혼합하여 준다. 그 후 아민으로 치환된 다공성 실리콘 을 넣고 상온에서 12시간 반응 시킨 후 ethanol, methylene chloride, acetone 순으로 세척한 다음 질소가스로 건조시켜 준다. 그리고 반응된 biotin의 결합의 여부는 Figure 25D에 의해 확인할 수 있었다. biotin의 머 리에 해당하는 C-C 신축진동은 1652cm⁻¹에서 확인하였다.



Scheme 6

2-2. Multi arrayed 다공성 실리콘의 아민화 정도 확인

아민 그룹의 표면 고정화 작업의 정도를 확인하기 위해서 2-pyridyl-2-carboxyethyl disulfide를 표면에 결합시키고 dithiothreitol(DTT)에 의해 떨어지는 2-thiopyridone의 양을 분석했다. 이 는 Scheme 7에 의해서 실시하였다.



Scheme 7.

방출되는 2-thiopyridone의 정량을 UV/vis spectroscopy (λ_{max} = 343nm, ϵ = 8.08 × 10³ M⁻¹cm⁻¹)를 통해 확인하였다. 60mA/mm² 전류에 의해 식 각된 실리콘 칩의 경우 연결된 분자의 숫자는 대략 30-80%가 표면에 결합 한다고 했을 때 그 정량은 137 nmol/mm² 이다. 이를 계산해보면 구멍의 크 기는 평균 25-90nm 이고 0.071cm²의 영역에 평균 0.03Å² 간격으로 바이오 틴 결합이 붙어있다.

3. Multi arrayed 다공성 실리콘을 이용한 Human IgG의 탐지 결과

이렇게 제작된 다공성 실리콘 바이오센서를 이용하여 생물분자인 streptavidin과의 분자인식에 대하여 연구를 수행하였다. 연구방법은 생물분 자가 기질과 결합함으로서 발생하는 굴절률의 변화로 인해 반사피크가 장파 장으로 변위를 하게 된다. 이때, 감지 신호를 증폭하는 방법으로 장파장 변위 를 광학두께의 변화로 변형하여 분석하였다.



Figure 26. Optical reflective spectra of protein A-functionalized PSi sample before (red) and after (blue) exposure of human IgG.

유도체화된 다공성 실리콘을 flow cell에 고정시키고 Phospate buffer solution(PBS)을 흘려주며 최초의 반사파장을 측정한다. 다음 cell에 PBS에 streptavidin(20uM)을 녹여 0.8mL/min의 속도로 흘려준다. 굴절율 n의 증 가로 인해 유효광학두께는 그림 Figure 27처럼 변화하였다. 백금전극의 많은 영향으로 유효광학두께가 높은 첫 번째 자리부터 아홉 번째 자리까지 전체적 으로 streptavidin 과 자리결합을 하여 각각 유효광학두께가 증가한 것을 확 인할 수 있다. 다음으로 streptavidin의 남은 자리결합을 하고 항원 역활을 하는 biotinylted-proteinA를 PBS 용액에 녹여(20uM) 같은 속도로 cell에 흘려주었다.



Figure 27. Change of effective optical thickness after addition of each protein

Scheme 5와 같이 streptavidin의 남은 자리와 biotin이 결합된 proteinA 가 결합을 하여 굴절율 n의 증가로 Figure 27처럼 유효광학두께의 변화를 확인할 수 있었다. 이 때 순수한 PBS를 흘려주어도 이미 결합을 한 결합은 변화를 보이지 않고 최종 유효광학두께를 유지한다. 이렇게 proteinA로 유도 체화된 다공성 실리콘을 이용해 면역 화학 검사 시 면역성 질환, 만성 감염 증, malabsorption syndrome의 원인이 되는 항체 Human IgG를 탐지하는 센서로서의 기능을 확인하였다. 역시 PBS 용매에 IgG를 녹여(100uM) 0.8mL/min의 속도로 흘려준다. 항체인 IgG는 항원인 proteinA와 결합을 함 으로서 유효광학두께가 변화하는 것을 Figure 27에서 확인할 수 있다.

IV. Conclusion

식각면적의 지름을 2 mm² 정도로 작게 한 식각 모형 틀을 제작하여 침형 백금전극을 이용하여 사각파의 전류를 흘려주어서 비대칭으로 식각된 다공성 실리콘을 제작하였다. 이렇게 합성된 다공성 실리콘은 9개의 면적에서 서로 다른 광학 정보를 같는다. multi-arrayed 다공성 실리콘의 반사피크는 거리 에 따라 선형으로 단파장으로 이동하는 것을 확인하였고 전자 주사 현미경을 통해 백금의 위치와 가까운 첫 번째 자리는 많은 전류의 영향을 받아 pore의 크기가 큰 것을 멀어질수록 작아지는 것을 확인할 수 있었다. multi-arrayed 다공성 실리콘은 Fabry-Perot fringe patten으로 나타나는데 이는 사인파의 한 형태로 이를 FT 변화하여 신호를 증폭시켜 유효광학두께를 구하였다. 다공성 실리콘의 화학적, 광학적 특성은 FT-IR 스펙트럼을 이용하여 분석하 바이오틴이 유도화체된 다공성 실리콘의 광학 신호를 통하여 였다. streptavidin, proteinA, Human IgG 을 탐지하는 연구를 수행하였다. Phospate buffer solution에 용해된 streptavidin, proteinA, Human IgG 을 순차적으로 흘려 주었을 때 바이오틴과 바이오물질은 특수한 자리결합으 로 인하여 결합을 하게 되고 이는 다공성 실리콘의 굴절율에 영향을 주어 유 효광학두께가 증가하였다.

V. References

[1] Gaspard.F.; Bsiesy. A. ; Lingeon. M.; Muller. F. ; Herino. R. J. Electochem. Soc. 1989, 136, 3043.

[2] D. R. Turner, J. Electrochem. Soc., 105, 402(1958).

[3] L. T. Canham, Appl. Phys. Lett., 57, 1046(1990).

[4] R. F. Service, Science, 278, 806(1997).

[5] A .Janshoff, K. S. Dancil, C. Steinem, C. P. Greiner, V. S. -Y. Lin, C. Gurtner, K. Motesharei, M. J. Sailor, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 12108(1998).

[6] P.Steiner, W.Lang, Thin Solid Films 255, 52 (1995).

[7] S. D. Collins and R. L. Smith, J. Appl. Phys., 71(8), R1(1992).

[8] Victor S. -Y. Lin, K. Motesharei, K. S. Dancil, M. J. Sailor, M. R. Ghadiri, *Science*, 278, 840(1997).

[9] V. V. Doan , M. J. Sailor, Science, 256, 1791(1992).

[10] F. Moller, M. Ben Chorin, Thin Solid Films 255, 16 (1995).

저작물 이용 허락서

학	과	화학과	학 번	20077034	과 정	석 사	
성] 명 한글 : 박 재 현 한문 : 朴 在 鉉 영문 : Jaehyun Park.						
주	소	▷ 광주 광산구 산월동 부영3차 307-1204					
연락처		E-MAIL : aveinte@hanmail.net					
논문제목		한글 : 면역 단백질 감지를 위한 다공성 실리콘 나노바이오센서 영문 : Porous Silicon Nanobiosensor for Detection of Immunoprotein					

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저 작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

 지작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함.

2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.

 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.

5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.

 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음

7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2008년 11월 일

저작자: 박 재 현 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하



감사의글