(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0120627
(43) 공개일자 2021년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/00* (2018.01) *C12Q 1/58* (2006.01)
*G01N 27/30* (2006.01) *G01N 33/62* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/003* (2013.01)
*C12Q 1/58* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0037578
(22) 출원일자 2020년03월27일
심사청구일자 2020년03월27일

(71) 출원인
**한림대학교 산학협력단**
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
**박민**
서울특별시 동대문구 정릉천동로 36, 110동 701호
**성건용**
서울특별시 성동구 난계로 73, 102동 201호
**김지영**
서울특별시 노원구 덕릉로 459-18, 101동 1505호
(74) 대리인
**강현욱**

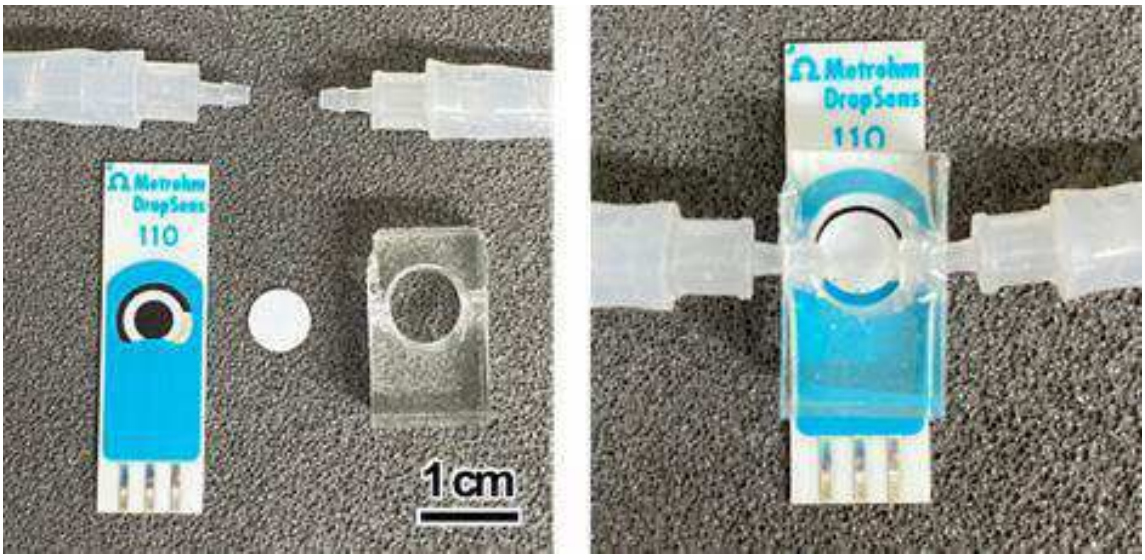
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **고효율로 고정화된 효소 고정용 다공성막 및 상기 효소 고정용 다공성막을 기반으로 하는 유동 조건에서 사용 가능한 휴대용 요소 바이오센서**

## (57) 요 약

본 발명은 고효율로 고정화된 효소 고정용 다공성막 및 상기 효소 고정용 다공성막을 기반으로 하는 유동 조건에서 사용 가능한 휴대용 요소 바이오센서에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 아민 작용기화된 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제로 반응시켜 상기 아민기가 활성 숙신이미딜기로 전환된 필름으로 코팅된 효소 고정용 다공성막, 상기 효소 고정용 다공성막의 제조방법, 상기 효소 고정용 다공성막을 이용한 유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서 및 요소의 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*C12Y 305/01005* (2013.01)
*G01N 27/30* (2013.01)
*G01N 33/62* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | NRF-2019R1I1A 3A01058192 |
| 부처명 | 교육부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 학문균형발전지원사업(지역대학) |
| 연구과제명 | 표면발현 기술을 활용한 신개념 glucose-6-phosphate 바이오센싱 기법 개발 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 한국연구재단 |
| 연구기간 | 2019.06.01 ~ 2021.05.31 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

아민 작용기화된 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제로 반응시켜 상기 아민기가 활성 숙신이미딜기로 전환된 필름으로 코팅된, 효소 고정용 다공성막.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 숙신이미딜계 가교제는 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 효소 고정용 다공성막.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 효소는 요소분해효소(urease)인 것을 특징으로 하는, 효소 고정용 다공성막.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 다공성 막은 불용성 다공성 막으로, 푸코이단, 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 히알루론산, 실크 피브로인, 폴리이미드(polyimides), 폴리아믹스 산(polyamix acid), 폴리카프로락톤(polycarprolactone), 폴리에테르이미드(polyetherimide), 나일론(nylon), 폴리아라미드(polyaramid), 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리아크릴로나이트릴(polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide), 폴리스티렌(polystyrene), 셀룰로오스(cellulose), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate), 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), PTFE(Polytetrafluoroethylene), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA}및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEGDA}로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 생체 적합성 재료인 것을 특징으로 하는, 효소 고정용 다공성막.

### 청구항 5

(1) 아민 작용기화된 파릴렌 필름을 상온에서 불용성 다공성 막에 균일하게 증착시키는 단계; 및

(2) 파릴렌 필름 증착 후, 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제와 반응시켜 상기 아민기를 활성 숙신이미딜기로 전환하는 단계;를 포함하는,

효소 고정용 불용성 다공성막의 제조방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 숙신이미딜계 가교제는 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 효소 고정용 불용성 다공성막의 제조방법.

**청구항 7**

(1) 아민 작용기화된 파릴렌 필름을 상온에서 불용성 다공성 막에 균일하게 증착시키는 단계;

(2) 파릴렌 필름 증착 후, 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제와 반응시켜 상기 아민기를 활성 숙신이미딜기로 전환하는 단계; 및

(3) 상기 파릴렌 필름 표면의 활성 숙신이미딜기와 유리 아민기를 가진 요소

분해효소(urease)를 화학 반응시켜 요소분해효소를 불용성 다공성 막에 고정화하는 단계;를 포함하는,

요소분해효소가 고정화된 불용성 다공성 막의 제조방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 숙신이미딜계 가교제는 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 요소분해효소가 고정화된 불용성 다공성 막의 제조방법.

**청구항 9**

제7항 또는 제8항의 방법으로 제조된 요소분해효소가 고정화된 불용성 다공성 막을 포함하는, 요소(urea) 측정용 바이오센서.

**청구항 10**

유체 챔버;

상기 유체 챔버 내에 위치하며, 요소분해효소가 숙신이미딜계 가교제를 이용한 화학결합에 의해 고정된 파릴렌-A 코팅 불용성 다공성 막;

상기 요소분해효소가 화학결합에 의해 고정된 파릴렌-A 코팅 불용성 다공성

막에 근접하게 위치하며 상기 막에서 발생하는 전기화학적 신호를 감지하는 작용전극, 상대 전극 및 기준 전극을 포함하는 스크린 인쇄된 3-전극 시스템;

상기 유체 챔버 내로 흐르는 상태의 시료를 유입하는 시료 유입구; 및

상기 유체 챔버로부터 외부로 시료가 흘러나가는 시료 유출구;를 포함하는,

유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

상기 숙신이미딜계 가교제는 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서.

**청구항 12**

제10항에 있어서,

상기 불용성 다공성 막은 푸코이단, 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 히알루론산, 실크 피브로인, 폴리이미드(polyimides), 폴리아믹스 산(polyamix acid), 폴리카프로락톤(polycarprolactone), 폴리에테르이미드(polyetherimide), 나일론(nylon), 폴리아라미드(polyaramid), 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리아크릴로나이트릴(polyacrylonitrile), 폴리

에틸렌옥사이드(polyethylene oxide), 폴리스티렌(polystyrene), 셀룰로오스(cellulose), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate), 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), PTFE(Polytetrafluoroethylene), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA}및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEGDA}로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 생체 적합성 재료로 제조된 것임을 특징으로 하는, 유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서.

**청구항 13**

제10항에 있어서,

상기 유체 챔버와 상기 3-전극 시스템을 감싸는 하우징을 더 포함하는 것을

특징으로 하는, 유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서.

**청구항 14**

제10항에 있어서,

상기 3-전극 시스템의 작용 전극은 아민화된 것임을 특징으로 하는, 유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서.

**청구항 15**

제10항에 있어서,

상기 3-전극 시스템은 외부의 전기화학 분석장치와 연결하여 유체 챔버 내의

전기화학 신호를 탐지하는 것을 특징으로 하는, 유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서.

**청구항 16**

제10항의 휴대용 요소 바이오센서를 이용하여 전기화학적 방법으로 유동상태의 시료에 존재하는 요소의 농도를 측정하는 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서,

상기 시료는 생물학적 시료로서 혈액, 혈청, 소변, 눈물 및 땀으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 요소의 농도를 측정하는 방법.

**청구항 18**

제16항에 있어서,

상기 유동상태의 시료는 0.5 내지 10mL/min의 유속으로 흐르는 것을 특징으로 하는, 요소의 농도를 측정하는 방법.

**청구항 19**

제16항에 있어서,

상기 휴대용 요소 바이오센서는 요소 농도가 0.6 내지 20mM로 포함된 시료 중에서 요소 검출이 가능한 것을 특징으로 하는, 요소의 농도를 측정하는 방법.

## *발명의 설명*

## 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 숙신이미딜(succinimidyl) 기반의 가교제를 이용하여 고효율로 고정화된 효소 고정용 다공성막 및 상기 효소 고정용 다공성막을 기반으로 하는 유동 조건에서 사용 가능한 휴대용 요소 바이오센서에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 바이오센서는 생체 분자를 검출하는 분석 장치로서, 일반적으로 분자인식 층, 변환기 및 신호 발생기의 3개의 구성요소로 구성되어 있다. 분자인식 층의 경우, 항체, 앱타머, 효소, 수용체 등과 같은 다양한 생체 분자를 이용하여 특정 분석대상 물질을 포획하는데 사용되어 왔다. 특히 효소 기반 바이오센서는 효소가 분석대상 물질을 포착하고 측정 가능한 인식 신호를 생성하는데 사용될 수 있기 때문에 효과적인 분석 장치라 할 수 있다.

[0003] 한편 요소(urea)를 가수 분해하는 우레아제(urease, 요소분해효소)는 요소(ureas)를 검출하는데 사용된다.

[0004] 요소는 간에서 일어나는 단백질의 분해 과정에서 암모니아로부터 합성된 화합물이며, 신진 대사의 최종 질소 생성물이다. 포유동물과 양서류에서 독성이 높은 암모니아는 오르니틴 사이클에 의해 상대적으로 독성이 낮은 요소로 변형된다. 합성된 요소는 신장에 저장되고 소변을 통해 체내에서 배출된다. 따라서 요소는 신장 기능 장애를 확인하기 위한 중요한 바이오 마커이다.

[0005] 이러한 이유로, 요소를 측정할 수 있는 우레아제에 기초한 다양한 바이오센서가 전기 화학, 광학, 압전적 검출 분석법들이 개발되었다. 이 중에서 전기화학적 요소 바이오센서는 감도가 높고 효율적이고 신속한 분석이 가능하여 널리 개발되어 왔다. 또한 다양한 전기화학적 요소 바이오센서가 전류 측정, 전압 전류법 및 임피던스 분광법에 기초하여 연구되고 있지만, 실제 사용과 관련된 단점은 여전히 논쟁의 여지를 가지고 있다.

[0006] 요소 바이오센서의 문제점으로는 좁은 동적 범위와 정적 측정 조건으로, 실제 생리학적 시료의 실시간 모니터링을 위해서는 유동 조건에서의 바이오 센싱이 필수적이다. 즉, 혈액이나 소변 수집 후 정체 상태에서의 요소 농도 측정은 용이하게 측정할 수 있지만 혈액투석이나 복막투석 등 투석 진행 상황을 모니터링 하기 위해서는 유동 상태에서 요소 농도를 측정할 수 있어야 한다. 하지만 유동 상태에서 성공적인 바이오 센싱을 가능하게 하는 기술이 아직 개발되지 못하고 있는 실정이다.

[0007] 효소-기반 바이오센서에서 민감한 분자 인식 층의 형성을 위해서는 트랜스 듀서 또는 고체 지지체 상에 효소를 고정시키는 기술이 핵심 기술 중 하나이다 (Delvaux and Demoustier-Champagne 2003; Wang et al. 2003). 지지체 상에 효소를 고정하기 위해 물리적 흡착, 효소 포획 및 가교와 같은 다양한 고정화 기술이 보고된 바 있고, 그 중에서도 가교에 의한 공유 고정화는 고체 지지체와 효소 사이를 가장 강하게 결합하는 방법으로 여겨지고 있다.

[0008] 특히, 동형이중기능적 가교제(homobifunctional crosslinker)인 글루타알데히드(glutaraldehyde: GA)는 단백질의 아미노기에 대한 강력한 반응성으로 인해 효소 고정화, 생물학적 시료 고정, 생체 촉매 설계 등 다양한 분야에 널리 사용되고 있다. 그러나 글루타알데히드(glutaraldehyde: GA)는 쉽게 GA 분자가 폴리머화(polymerization)되고 알데히드기의 안정성 및 아민-알데히드 반응의 가역성과 같은 문제점을 가지고 있다.

[0009] 또한 효소 고정화의 경우, 반응성 작용기뿐만 아니라 기능성 말단 사이의 간격 길이도 중요하다. 가교제에서 동일한 기능기로 링커의 길이를 변경함으로써 고정화 효소의 활성이 변화될 수 있고, 이는 바이오센서의 민감도에 직접적으로 영향을 줄 수 있다.

[0010] 따라서 유동 조건에서 요소를 효과적으로 모니터링 할 수 있는 효소 고정화 기술 및 이를 이용한 새로운 바이오센서의 기술개발이 필요한 실정이며, 이에 본 발명자들은 요소분해효소의 고정화를 향상시킬 수 있기 위한 방법으로 동형이중기능적 디숙신이미딜 가교제를 사용하여 요소분해효소 고정화 막을 제조하는 기술을 개발하였고, 이를 기반으로 하는 휴대용 요소 바이오센서를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2015-0092474호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1552041호

(특허문헌 0003) 한국공개특허 제10-2016-0131311호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 아민 작용기화된 파릴렌 코팅 다공성막에 높은 효율로 효소를 고정화시키기 위하여, 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제로 반응시켜 아민기가 활성 숙신이미딜기로 전환된 필름으로 코팅된 효소 고정용 다공성막 및 이의 제조방법을 제공하려는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 효소 고정용 다공성막을 포함하며, 검출 결과에 대한 재현성 및 검출 민감도가 우수하고 휴대 가능한 요소(urea) 바이오센서를 제공하려는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 휴대용 요소 바이오센서를 이용하여 전기화학적 방법으로 유동상태의 시료에 존재하는 요소의 농도를 측정하는 방법을 제공하려는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 아민 작용기화된 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제로 반응시켜 상기 아민기가 활성 숙신이미딜기로 전환된 필름으로 코팅된, 효소 고정용 다공성막을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 숙신이미딜계 가교제는 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소는 요소분해효소(urease)일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 다공성 막은 불용성 다공성 막으로, 푸코이단, 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 히알루론산, 실크 피브로인, 폴리이미드(polyimides), 폴리아믹스 산(polyamix acid), 폴리카프로락톤(polycarprolactone), 폴리에테르이미드(polyetherimide), 나일론(nylon), 폴리아라미드(polyaramid), 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리아크릴로나이트릴(polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide), 폴리스티렌(polystyrene), 셀룰로오스(cellulose), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate), 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), PTFE(Polytetrafluoroethylene), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA}및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEGDA}로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 생체 적합성 재료일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은, (1) 아민 작용기화된 파릴렌 필름을 상온에서 불용성 다공성 막에 균일하게 증착시키는 단계; 및 (2) 파릴렌 필름 증착 후, 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제와 반응시켜 상기 아민기를 활성 숙신이미딜기로 전환하는 단계;를 포함하는, 효소 고정용 불용성 다공성막의 제조방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 숙신이미딜계 가교제는 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0021] 또한 본 발명은, (1) 아민 작용기화된 파릴렌 필름을 상온에서 불용성 다공성 막에 균일하게 증착시키는 단계; (2) 파릴렌 필름 증착 후, 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제와 반응시켜 상기 아민기를 활성 숙신이미딜기로 전환하는 단계; 및 (3) 상기 파릴렌 필름 표면의 활성 숙신이미딜기와 유리 아민기를 가진 요소분해효소(urease)를 화학 반응시켜 요소분해효소를 불용성 다공성 막에 고정화하는 단계;를 포함하는, 요소분해효소가 고정화된 불용성 다공성 막의 제조방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 숙신이미딜계 가교제는 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0023] 또한 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 요소분해효소가 고정화된 불용성 다공성 막을 포함하는, 요소(urea) 측정용 바이오센서를 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은, 유체 챔버; 상기 유체 챔버 내에 위치하며, 요소분해효소가 숙신이미딜계 가교제를 이용한 화학결합에 의해 고정된 파릴렌-A 코팅 불용성 다공성 막; 상기 요소분해효소가 화학결합에 의해 고정된 파릴렌-A 코팅 불용성 다공성

[0025] 막에 근접하게 위치하며 상기 막에서 발생하는 전기화학적 신호를 감지하는 작용전극, 상대 전극 및 기준 전극을 포함하는 스크린 인쇄된 3-전극 시스템; 상기 유체 챔버 내로 흐르는 상태의 시료를 유입하는 시료 유입구; 및 상기 유체 챔버로부터 외부로 시료가 흘러나가는 시료 유출구;를 포함하는, 유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서를 제공한다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 숙신이미딜계 가교제는 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 불용성 다공성 막은 푸코이단, 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 히알루론산, 실크 피브로인, 폴리이미드(polyimides), 폴리아믹스 산(polyamix acid), 폴리카프로락톤(polycarprolactone), 폴리에테르이미드(polyetherimide), 나일론(nylon), 폴리아라미드(polyaramid), 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리아크릴로나이트릴(polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide), 폴리스티렌(polystyrene), 셀룰로오스(cellulose), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate), 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), PTFE(Polytetrafluoroethylene), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA}및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEGDA}로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 생체 적합성 재료로 제조된 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유체 챔버와 상기 3-전극 시스템을 감싸는 하우징을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 3-전극 시스템의 작용 전극은 아민화된 것일 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 3-전극 시스템은 외부의 전기화학 분석장치와 연결하여 유체 챔버 내의 전기화학 신호를 탐지하는 것일 수 있다.

[0031] 또한 본 발명은 본 발명의 휴대용 요소 바이오센서를 이용하여 전기화학적 방법으로 유동상태의 시료에 존재하는 요소의 농도를 측정하는 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 시료는 생물학적 시료로서 혈액, 혈청, 소변, 눈물 및 땀으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유동상태의 시료는 0.5 내지 10mL/min의 유속으로 흐르는 것일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 휴대용 요소 바이오센서는 요소 농도가 0.6 내지 20mM로 포함된 시료 중에서 요소 검출이 가능한 것일 수 있다.

## *발명의 효과*

[0035] 본 발명에 따른 효소 고정용 다공성막은 가교제로서 숙신이미딜계 가교제를 사용함으로써 종래 글루타알데히드 가교제에 비해 고효율로 효소를 고정화시킬 수 있고 고정화된 효소가 높은 활성을 갖는 효과가 있다.

[0036] 또한 본 발명의 효소 고정용 다공성막을 기반으로 하는 요소 바이오센서는 상기 다공성막에 고효율로 요소분해효소가 고정화되어 있어 높은 민감도로 정확하게 요소의 농도를 측정할 수 있는 효과가 있다.

[0037] 또한 본 발명의 요소 바이오센서는 유동 상태의 시료를 대상으로도 요소 농도를 측정할 수 있어, 혈액 투석이나 복막 투석 중에도 실시간으로 요소 측정이 가능하다는 장점이 있을 뿐만 아니라 본 발명의 요소 바이오센서는 크기가 작고 다루기가 편리하여 휴대가 용이하므로 사용 장소의 제약이 없고, 고농도 요소까지 검출할 수 있어 넓은 농도범위에 요소를 정량적으로 측정할 수 있는 효과가 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명에 다른 휴대용 요소 바이오센서의 구성 단위(a) 및 전체 구성도(b)를 나타낸 사진이다.

도 2는 가교제 종류에 따른 파릴렌-A 코팅된 마이크로 플레이트에 고정화된 요소분해효소에 대한 활성도를 측정한 결과를 나타낸 것이다. 여기서 회색 막대는 상업적 요소 분석키트를 사용한 것이고, ■는 전기 화학적 방법을 통해 활성을 측정 한 것이다.

도 3은 가교제 종류에 따른 파릴렌-A 코팅된 PTFE 막에 고정화된 요소분해효소의 활성도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 요소분해효소를 파릴렌-A 코팅된 PTFE 막에 고정화시키는 과정에 대한 모식도 및 각 단계별 막 표면의 상태를 SEM으로 관찰한 사진을 나타낸 것으로, (a)는 아무것도 처리하지 않은 PTFE 막을, (b)는 파릴렌-A 코팅된 PTFE 막을, (c)는 가교제인 DSS를 처리한 막을, (d)을 요소분해효소가 고정화된 막을 나타낸 것이다.

도 5는 요소분해효소를 고정화시키는 각 단계에 대한 (FT-IR(Fourier-transform infrared) 분석 스펙트럼을 나타낸 것으로, (a)는 아무것도 처리하지 않은 PTFE 막을, (b)는 파릴렌-A 코팅된 PTFE 막을, (c)는 가교제인 DSS를 처리한 막을, (d)을 요소분해효소가 고정화된 막을 나타낸 것이다.

도 6은 PBS에 용해된 요소를 검출한 결과에 관한 것으로, (a)는 가교제 종류에 따른 요소분해효소가 고정된 막을 이용하여 요소를 실시간으로 모니터링 한 결과를 나타낸 것이고, (b)는 요소 농도에 다른 센서의 반응도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 실제 혈청내 요소를 검출한 결과에 관한 것으로, (a)는 가교제인 DSS를 이용하여 요소분해효소를 고정시킨 막을 이용하여 실시간으로 요소 농도를 모니터링 한 결과를 나타낸 것이고, (b)는 요소 농도에 다른 센서의 반응도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 가교제인 DSS를 이용하여 요소분해효소를 고정시킨 막을 기반으로 하는 본 발명의 요소 바이오센서에 대한 재현성을 분석한 결과이다.

도 9는 유동 조건에서 서로 다른 종류의 간섭 종을 이용하여 본 발명의 DSS 가교제를 기반으로 하는 요소 바이오센서에 대한 간섭도(선택성)를 분석한 결과를 나타낸 것으로, 간섭 종으로 2 μM uric acid (UA), 30 μM glucose (Glu), 2 μM glycine (Gly), 3 mM sodium chloride (NaCl), 및 50 μM sucrose (Suc)를 각각 사용하였다.

도 10은 본 발명의 일실시예에서 사용한 글루타알데히드 가교제 및 숙신이미딜계 가교제들의 구조를 나타낸 것이고(a), 숙신이미딜계 가교제를 이용하여 요소분해효소(urease)가 고정화된 모식도(b)를 나타낸 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명은 아민 작용기화된 파릴렌 코팅 다공성막에 높은 효율로 효소가 고정화된 효소 고정용 다공성막에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 파릴렌(parylene) 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제로 반응시켜 아민기가 활성 숙신이미딜기로 전환된 필름으로 코팅된 효소 고정용 다공성막 및 이의 제조방법을 제공함에 특징이 있다.

[0040] 특히 본 발명에서는 숙신이미딜계 가교제를 사용할 경우, 다공성막에 고효율로 효소를 고정화시킬 수 있고, 고정화된 효소가 높은 활성을 갖도록 하여, 검출하고자 하는 타겟 물질을 효과적으로 검출, 측정 또는 분석할 수 있음을 확인하였다.

[0041] 본 발명에서 상기 다공성 막에 숙신이미딜계 가교제를 이용하여 고정하고자 하는 효소는 생물학적 시료에 함유된 타겟 물질을 검출하기 위한 용도로 사용 가능한 효소 등의 단백질이라면 모두 사용할 수 있으며, 본 발명의

일실시예에서는 요소분해효소(urease)를 사용하였다.

[0042] 본 발명의 일실시예에 의하면, 가교제로서 숙신이미딜계 가교제 및 종래 가장 널리 사용되는 글루타알데히드 가교제(GA: glutaraldehyde)를 이용하였고 요소분해효소를 고정화시킨 요소분해효소(urease)가 고정화된 불용성 다공성 막을 제조하였고, 요소분해효소의 활성도를 분석하였는데, 그 결과, 글루타알데히드 가교제를 사용한 것에 비해 숙신이미딜계 가교제를 사용한 것이 효소의 활성도가 더 우수한 것으로 나타남에 따라 숙신이미딜계 가교제의 사용이 효소의 고정 효율을 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0043] 여기서 본 발명에서 사용할 수 있는 상기 숙신이미딜계 가교제는 이에 제한되지는 않으나, 디숙신이미딜 글루타레이트(Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 또는 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르($BS(PEG)_5$)일 수 있고, 바람직하게는 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 일 수 있다.

[0044] 또한 본 발명은 효소 고정용 다공성막의 제조방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은, (1) 아민 작용기화된 파릴렌 필름을 상온에서 불용성 다공성 막에 균일하게 증착시키는 단계; 및 (2) 파릴렌 필름 증착 후, 파릴렌 필름 표면의 아민기를 숙신이미딜계 가교제와 반응시켜 상기 아민기를 활성 숙신이미딜기로 전환하는 단계;를 포함한다.

[0045] 본 발명의 일실시예에서는, 상기 (2) 단계의 과정을 수행한 후, 상기 파릴렌 필름 표면의 활성 숙신이미딜기와 유리 아민기를 가진 요소분해효소(urease)를 화학 반응시켜 상기 요소분해효소를 불용성 다공성 막에 고정화하는 단계를 추가로 수행하여, 요소분해효소가 고정화된 불용성 다공성 막을 제조하였다.

[0046] 여기서 상기 숙신이미딜계 가교제를 이용하여 요소분해효소(urease)를 고정화시킨 모식도 및 본 발명에서 사용한 숙신이미딜계 가교제들의 구조를 도 10에 나타내었다.

[0047] 본 발명에서 사용 가능한 상기 불용성 다공성막은, 이에 제한되지는 않으나, 불용성 다공성 막으로, 푸코이단, 콜라겐, 알지네이트, 키토산, 히알루론산, 실크 피브로인, 폴리이미드(polyimides), 폴리아믹스 산(polyamix acid), 폴리카프로락톤(polycarprolactone), 폴리에테르이미드(polyetherimide), 나일론(nylon), 폴리아라미드(polyaramid), 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 폴리벤질글루타메이트(poly-benzyl-glutamate), 폴리페닐렌테레프탈아마이드(polyphenyleneterephthalamide), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리아크릴로나이트릴(polyacrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide), 폴리스티렌(polystyrene), 셀룰로오스(cellulose), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate), 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), PTFE(Polytetrafluoroethylene), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA}및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEGDA}로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0048] 또한 본 발명은 본 발명의 요소분해효소가 고정화된 불용성 다공성 막을 포함하는 요소(urea) 측정용 바이오센서를 제공할 수 있다.

[0049] 구체적으로 본 발명의 요소 측정용 바이오센서는, 유체 챔버; 상기 유체 챔버 내에 위치하며, 요소분해효소가 숙신이미딜계 가교제를 이용한 화학결합에 의해 고정된 파릴렌-A 코팅 불용성 다공성 막; 상기 요소분해효소가 화학결합에 의해 고정된 파릴렌-A 코팅 불용성 다공성 막에 근접하게 위치하며 상기 막에서 발생하는 전기화학적 신호를 감지하는 작용전극, 상대 전극 및 기준 전극을 포함하는 스크린 인쇄된 3-전극 시스템; 상기 유체 챔버 내로 흐르는 상태의 시료를 유입하는 시료 유입구; 및 상기 유체 챔버로부터 외부로 시료가 흘러나가는 시료 유출구;를 포함한다.

[0050] 상기 본 발명의 요소 측정용 바이오센서는 유동상태의 시료에 존재하는 요소 농도를 측정하는 휴대용 요소 바이오센서이다.

[0051] 상기 유체 챔버는 전기 신호를 차단하지 않는 재질로 이루어진 유체 챔버를 사용할 수 있다.

[0052] 상기 휴대용 요소 바이오센서에 포함되는 숙신이미딜계 가교제를 이용한 화학결합에 의해 요소분해효소가 고정된 파릴렌-A 코팅 불용성 다공성 막은 다수 개를 사용할 수 있어 요소 바이오센서 내의 효소를 높은 농도로 유

지할 수 있어 검출 감도가 높다. 상기 본 발명의 다공성 막은 6~10개를 사용할 수 있고, 바람직하게는 8개를 사용할 수 있다.

[0053] 또한 본 발명의 요소 바이오센서는 유체 챔버와 상기 3-전극 시스템을 감싸는 하우징을 더 포함할 수 있으며, 상기 3-전극 시스템의 작용 전극은 아민화된 것일 수 있고, 상기 3-전극 시스템은 외부의 전기화학 분석장치와 연결하여 유체 챔버 내의 전기화학 신호를 탐지할 수 있다.

[0054] 나아가 본 발명은 본 발명의 휴대용 요소 바이오센서를 이용하여 전기화학적 방법으로 유동상태의 시료에 존재하는 요소의 농도를 측정하는 방법을 제공함에 특징이 있다.

[0055] 요소(urea)는 신장 기능의 중요한 지표로서 크레아티닌과 함께 널리 사용된다. 혈액 내 요소와 크레아티닌의 적정 범위는 각각 7-20mg/dL 및 0.7-1.2mg/dL이다. 신장은 생체 폐기물의 배출, 산, 염기 및 전해질의 대사 유지, 혈압 유지, 칼슘 및 인산염 대사를 조절하는 부갑상선 호르몬의 생성 및 활성화 등 많은 기능을 하는 콩 모양의 내분비 기관으로, 생체에 필수적이고, 심장에서 흘러나오는 혈액의 20-25%가 신장으로 흘러들어간다. 신장에 의해 여과되는 총 혈액량은 하루 180L이다. 혈액에서 여과된 대부분의 물은 재흡수되고, 1-2L만 소변으로 배출된다.

[0056] 한편, 항상성이 유지될 수 없도록 신장 기능이 손상된 상태를 신부전이라고 한다. 신부전증에 걸리면 사구체 여과율이 급격히 떨어지므로 혈청 내 요소 및 크레아티닌 농도가 증가한다. 급성 신부전증은 심한 부상 또는 신장에 혈액 공급 부족으로 인하여 복잡한 수술 후에 발생할 수 있다. 이 경우 신장 기능은 치료 후 정상으로 회복될 수 있다. 반면, 만성 신부전증은 초기 단계에는 특별한 증상이 없고, 고혈압 및 당뇨병과 같은 다양한 증상이 나중에 관찰된다. 만성 신부전이 지속되고 심해지면 말기 신부전(end-stage renal failure; ESRF)으로 진행할 수 있으며, 말기 신부전 시에는 신장 이식이 수행되어야 하며, 이식이 수행될 때까지 혈액 투석 또는 복막 투석이 필요한데, 혈액이나 복막에서 요소와 크레아티닌 농도가 투석 진행의 주요 지표이다.

[0057] 따라서 요소의 농도를 정확하게 검출, 측정 및 분석하는 것은 요소 관련 질환의 진단, 치료, 예후관찰 등에 있어서 매우 중요하다.

[0058] 이러한 점에서 본 발명에서 제공하는 효소 고정용 다공성막을 이용한 휴대용 요소 바이오센서는 시료 내에 존재하는 요소를 신속하고 정확하게 측정 또는 검출할 수 있다.

[0059] 효소 고정용 다공성 막에 고정화된 요소분해효소 활성에 의한 요소 검출은 전기 화학적 측정을 통해 수행되어지는데, 요소분해효소는 요소의 가수 분해를 촉매하여 다음과 같이 이산화탄소와 암모니아로 가수분해된다.

[0060] $(NH_2)_2CO$ (요소) + $H_2O$ → $CO_2$ + $2NH_3$

[0061] 요소분해효소는 요소를 암모니아 및 카바메이트 분자로 가수분해하며, 불안정한 카바메이트는 이어서 제2 암모니아 분자 및 이산화탄소 분자로 분해된다. 수용액에서 암모니아는 전하를 띤 암모늄 이온으로 존재하며, 이는 요소분해효소에 의한 요소의 가수분해 과정에서 전기 화학 신호를 생성한다. 신호의 강도는 존재하는 암모늄 이온의 양에 비례하며, 따라서 요소분해효소 기반 전기 화학적 바이오센서는 정량 분석이 가능하다.

[0062] 높은 감도를 얻기 위해서는 검출 가능한 양의 암모늄 이온을 생성하기 위해 고농도의 요소분해효소가 필요하다. 따라서 높은 밀도의 요소분해효소를 고정하는 것이 필수적이다. 이러한 점에서 본 발명에서 제공하는 효소 고정화 다공성막은 요소분해효소의 고정화 효율을 증가시킬 수 있어 검출 감도를 향상시킬 수 있다.

[0063] 본 발명의 요소 바이오센서가 적용할 수 있는 시료는 생물학적 시료라면 모두 사용 가능하며, 이에 제한되지는 않지만, 혈액, 혈청, 소변, 눈물 또는 땀일 수 있다.

[0064] 또한 본 발명의 요소 바이오센서는 유동상태의 시료에서도 요소 검출이 가능한 특징이 있는데, 시료가 0.5 내지 10mL/min의 유속으로 흐르는 상태에서도 요소의 검출이 가능하며, 요소 농도가 0.6 내지 20mM로 포함된 시료 중에서 요소 검출이 가능하다.

[0065] 종래 대부분의 검출용 바이오센서는 정적 조건의 시료를 대상으로만 수행되었다. 혈액이나 소변과 같이 수집 후 정체 상태에서의 요소 농도 측정은 종래 바이오센서를 이용한 진단이 가능할 수 있으나, 혈액 투석이나 복막 투석과 같이 유동조건이 수반되는 투석 진행 상황을 모니터링하기 위해서는 종래 바이오센서로는 검출이 어려운 문제가 있다.

[0066] 한편, 본원발명의 요소 바이오센서는 유동 상태의 시료를 대상으로도 요소 농도를 측정할 수 있어, 혈액 투석이

나 복막 투석 중에도 실시간으로 요소 측정이 가능하다는 장점이 있다.

[0067] 뿐만 아니라 본 발명의 요소 바이오센서는 크기가 작고 다루기가 편리하여 휴대가 용이하므로 사용 장소의 제약이 없고, 20mM의 고농도 요소까지 검출할 수 있어 넓은 농도범위에서의 요소를 보다 정량적으로 정확하게 높은 민감도로 측정할 수 있다.

[0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0071] **<준비예>**

[0072] **시약**

[0073] 요소분해효소(Canavalia ensiformis 유래), 요소(urea), 인간 혈청, 글루타알데히드(glutaraldehyde: GA), 암모늄 카바메이트(ammonium carbamate), 인산수소이나트륨(disodium hydrogen phosphate), 인산이수소칼륨(potassium dihydrogen phosphate), 요산, 글루코스, 글리신, 염화나트륨 및 수크로스는 Merck 사 (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 디숙신이미딜 글루타레이트 (Disuccinimidyl glutarate (DSG)), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate (DSS)) 및 비스-N-숙신이미딜-(펜타에틸렌 글리콜) 에스테르(BS(PEG) 5)는 Thermo Fischer Scientific (MA, US)사에서 구입하여 사용하였다. 요소 분석 키트는 BioAssay Systems (CA, US)사로부터 구입하였고, 인산 완충 식염수(PBS)는 LPS 솔루션(대전, 한국)으로부터 구입한 것을 사용하였다. 공극 크기 1.00 μm를 갖는 다공성폴리테트라플루오로에틸렌(polytetrafluoroethylene: PTFE) 막은 Advantec MFS (CA, US)사로부터 구입하여 사용하였다.

[0075] **<실험방법>**

[0076] **PTFE 막에 파릴렌 코팅 및 요소분해효소 고정화**

[0077] PTFE 막의 표면 및 96-웰 마이크로 플레이트는 파릴렌-A를 이용하여 코팅함으로써 활성 아민으로 개질시켰다. 100 nm의 두께를 갖는 파릴렌 박막은 아래 절차에 따라 증착시켰다. (1) 아민으로 작용기화 된 파릴렌 다이머를 160℃에서 증발시켰다. (2) 다이머는 650℃에서 열분해되어 고반응성 아민-작용기화 된 p-자일렌 라디칼을 생성하였다. (3) 아민-작용기화 된 자일렌 필름을 상온에서 PTFE 막 또는 마이크로 플레이트 상에 균일하게 증착시켰다. 아민 작용기화된 표면은 1mM의 가교제인 GA, DSS, DSG 및 $BS(PEG)_5$로 1시간 동안 각각 처리함으로써 상기 표면의 아민기를 아민 활성기인 활성 알데히드기 및 활성 숙신이미딜기로 전환시켰다. 표면 개질 후, 48 mg $mL^{-1}$의 요소분해효소를 처리하여 아민 활성기와 요소분해효소의 유리 아민기 사이의 공유 결합을 통해 PTFE 막에 요소분해효소를 고정화시켰다.

[0079] **요소분해효소 활성 측정**

[0080] 시판 요소 분석 키트를 사용하여 요소 농도를 측정하였다. 마이크로플레이트를 이용한 활성 측정을 위해, 16.67 mM 우레아를 웰에 첨가하고 25 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. PTFE 막을 이용한 활성 측정을 위해, 막을 16.67 mM 요소에 담근 후, 진탕하면서 25 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 요소분해효소가 고정된 마이크로플레이트 또는 PTFE 막을 이용하여 요소를 가수 분해한 후, 가수 분해된 요소 용액 5 μL를 96 웰 마이크로플레이트로 옮기고 200 μL의 프탈알데히드 시약을 20 분 동안 처리하였다. 이어서 요소분해효소의 활성을 520 nm의 파장에서 광학 밀도 (OD) 측정에 의한 비색법으로 측정하였다.

[0082] **유동 시스템(flow system) 및 요소 바이오센서(urea biosensor)의 제조**

[0083] 도 1에 나타낸 바와 같이, 폴리디메틸실록산(PDMS)을 이용하여 직경이 8 mm이고 높이가 5 mm인 원통형 유체 챔버를 제조하였다. 8개의 요소분해효소 고정화 막을 유체 챔버에 위치시키고 4mm 직경의 작업 전극(Metrohm, 스위스 Herisau)을 갖는 아민화된 스크린 인쇄된 유리질 탄소 전극을 유체 챔버 아래에 위치시켰다(도 1b 참조).

유체 챔버를 2mm 높이의 PDMS로 덮고, 입구 및 출구 튜브를 유체 챔버의 측면에 설치하였다. 유체 챔버의 모든 구성부를 제조한 후, 챔버를 폭 2 cm, 길이 3.5 cm 및 높이 1.5 cm를 갖는 하우징에 조립하여 본 발명에 따른 요소 바이오센서 유동 시스템을 제조하였다.

[0085] **유동 조건에서 전기화학적 측정**

[0086] 요소 시료는 연동 펌프(ISMATEC, 독일 베르트 하임)에 의해 조절된 0.5 mL $min^{-1}$의 유속으로 입구 튜브를 통해 유체 챔버 내로 유입되며, 출구는 폐기물 병에 연결되었다. 3 전극을 potentiostats (Metrohm, Herisau, Switzerland) 에 연결하여 요소분해효소에 의한 요소의 가수분해로 생성된 전류를 측정하였다. 유동 조건에서 요소의 전기 화학적 측정은 일정한 전압 값(1.0V)에서 시간대 전류측정법(chronoamperometry)을 이용하여 수행하였다.

[0087]

[0088] **<실시예 1>**

[0089] **고체 지지체 상에서 가교제 종류별 요소분해효소의 고정화 및 활성분석**

[0090] 본 발명자들은 효율성이 높은 요소분해효소의 고정막을 제조하기 위해, 요소분해효소의 종류로서 다양한 간격을 갖는 디숙신이미딜 가교제인 DSG, DSS 및 $BS(PEG)_5$를 사용하여 파릴렌-A가 코팅된 PTFE 막에 공유결합으로 고정화시켰고, 이때 대조군으로는 GA를 가교제로 사용한 군을 사용하였다. DSG, DSS 및 $BS(PEG)_5$의 원자 간격은 각각 7.7Å, 11.4Å 및 21.7Å이다. DSG 및 DSS의 간격 구조는 알킬 사슬이고, $BS(PEG)_5$는 사슬에 5개의 유연한 에테르 결합을 포함한다. DSG, DSS 및 $BS(PEG)_5$의 순서로 가교제의 사슬 길이 및 유연성은 증가한다. 다공성 PTFE 막을 고체 지지체로 사용하였고, 요소분해효소를 다음 절차에 따라 고체 지지체 상에 고정화시켰다. (1) PTFE 막의 표면을 파릴렌-A로 코팅하여 아민기로 개질시켰고, (2) 아민 작용기화 된 표면을 가교제의 처리에 의해 숙신이미딜로 변형시켰으며, (3) 요소분해효소의 아민기를 통해 막 상에 요소분해효소를 고정화시켰다.

[0091] 이후 요소분해효소 고정화에 있어서 가교제 사슬의 길이 및 유연성의 효과는 파릴렌-A로 코팅된 마이크로 플레이트를 사용하여 분석하였다. 링커 길이를 확인할 수 있는 가교제는 요소분해효소가 공유결합으로 고정화된 파릴렌-A 코팅된 96-웰 마이크로 플레이트에 처리되었다. 요소분해효소가 고정화되면 이후 요소분해효소의 활성을 측정하였다. 또한 이때 디알데히드 작용기를 갖는 가장 대표적인 가교제인 GA를 처리한 군을 대조군으로 사용하였다.

[0093] 분석 결과, 각기 다른 가교제인 DSG, DSS, $BS(PEG)_5$ 및 GA를 사용한 군에서의 요소분해효소의 활성은 각각 267.6 mU, 274.2 mU, 258.7 mU, and 250.1 mU으로 측정되었다. 마이크로플레이트를 이용한 활성 분석의 경우, 모든 디숙신이미딜 가교제를 사용한 군이 GA를 사용한 군보다 높은 요소분해효소 활성값을 나타내었다. 특히 DSS를 사용하여 고정화된 군에서는 가장 높은 활성값을 나타내었다(도 2 참조).

[0094] 또한, 본 발명자들은 마이크로 플레이트상에 고정화된 요소분해효소의 활성을 전기화학 분석을 통해 측정하였다.

[0095] 그 결과, DSG, DSS, $BS(PEG)_5$ 및 GA 샘플로부터의 전류 값은 각각 95.1 μA, 136.4 μA, 59.5 μA 및 13.8 μA인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 상기 요소분해효소의 활성 분석과 동일한 결과를 나타내었는데, 즉 모든 디숙신이미딜 가교제를 사용한 군이 GA를 사용한 군보다 더 높은 전류 값을 보였고, 역시 DSS를 사용하여 고정화된 군이 가장 높은 전류 값을 나타내었다.

[0096] 따라서 본 발명자들은 이러한 결과를 통해 가교제로서 가장 많이 사용되고 있는 GA를 사용하는 것에 비해 디숙신이미딜 가교제를 사용할 경우, 요소분해효소의 고정 효율이 더 우수한 것으로 나타났고, 특히 디숙신이미딜 가교제 중에서 DSS가 요소분해효소의 고정 효율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0098] 나아가 본 발명자들은 직경 8mm의 다공성 PTFE 막을 파릴렌-A로 코팅하여 상기 막 표면에 작용성 아민기를 노출

시켰다. 이후 요소분해효소의 고정화를 위해 가교제를 처리하였다. 그런 뒤, 고정화 된 요소분해효소의 활성을 측정하였고, 이때 대조군으로는 가교제로 GA를 처리한 군을 사용하였으며, 또한 임의의 가교제 없이 요소분해효소를 물리적으로 흡착시킨 군을 음성 대조군으로 사용하였다.

[0099] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 가교제 종류별 요소분해효소의 활성도를 측정한 결과, DSG, DSS, $BS(PEG)_5$, GA, 및 음성대조군의 활성은 각각 179.7mU, 226.8mU, 203.4mU, 205.1mU 및 100.4mU인 것으로 나타났다. 가교제를 처리하여 고정화된 요소분해효소를 갖는 막이(DSG, DSS, $BS(PEG)_5$, GA) 가교제를 사용하지 않은 막(물리적 흡착 적용 막)에 비해 약 1.8 배 이상의 높은 활성을 보였으며, 화학적 가교제들 중에서 DSS가 가장 높은 요소분해효소 활성을 보였다.

[0100] 특히 DSS를 처리한 군은 DSG, $BS(PEG)_5$ 및 GA보다 각각 26.8 %, 11.5 % 및 10.6 % 활성이 더 높은 것으로 나타났다. 마이크로 플레이트 및 막에 기반한 고정화 된 요소분해효소의 활성 실험을 통해, DSS가 가장 높은 고정화 효율을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0101] 한편, DSG, DSS 및 $BS(PEG)_5$는 서로 다른 링커 길이를 갖는 디숙신이미딜 가교제이고, 이 중에서 $BS(PEG)_5$는 가장 긴 사슬 길이 및 유연성을 갖는다. 링커 길이의 측면에서, 더 길거나 더 유연한 연결성을 갖는 고정화된 효소는 더 많은 자유도(degree of freedom)를 가지며 더 높은 효소 활성을 보인다. 따라서 이론적인 관점에서는 $BS(PEG)_5$가 가장 높은 고정 효율을 가질 것으로 예측되었지만 앞서 실험 결과에서 보였듯이 실제 결과는 이와는 다른 결과를 보였다.

[0102] 이러한 결과를 토대로 볼 때, 길고 유연한 가교제는 동일한 고체 지지체상에서 아민기를 갖는 숙신이미딜기와 반응할 가능성이 더 높다. 이 반응에 의해 가교제의 활성이 사라지고 동시에 효소 고정화 부위가 감소한다. 결과적으로, 가교제의 효소 고정 효율은 링커 길이에 비례하지 않는다는 것을 알 수 있다.

[0103] 따라서 상기 실험 결과에 따라, 아민이 활성화된 고체 표면에서 DSG, DSS 및 $BS(PEG)_5$ 가교제를 사용하여 요소분해효소를 고정화 시킬 경우, DSS를 사용하는 것이 가장 높은 고정화 효율을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

[0104]

[0105] **<실시예 2>**

[0106] **DSS 가교제를 이용한 요소분해효소 고정화 막에 대한 분석**

[0107] 유동 조건에서 본 발명의 요소분해효소 고정화막을 이용하여 요소 바이오센싱이 가능한지 확인하기 위해, 상기 실시예 1에서 사용한 디숙신이미딜 가교제 중에서 가장 활성이 우수한 DSS를 이용하여 요소분해효소 고정화 막을 제조하면서 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0108] 평균 기공 크기가 1μm 인 다공성 구조를 갖는 PTFE 막을 고체 지지체로 사용하였으며, 이때 다공성 구조는 표면적을 증가시켜 더 많은 요소분해효소의  고정 부위를 제공할 수 있고 유동 조건에서 전기 화학적 신호를 측정하는데 효과적이다.

[0109] 먼저 본 발명자들은 DSS를 이용하여 요소분해효소 고정화 막을 제조하는 각 단계에서 막의 미세구조를 SEM을 사용하여 관찰하였다.

[0111] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, PTFE 막은 미세 다공성 구조가 있는 것으로 관찰되었고, 이러한 다공성 구조는 파릴렌-A 코팅에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 고체 지지체의 표면이 미세 구조에 영향을 미치지 않으면서 활성 아민기로 개질되었음을 의미한다. 또한 이러한 다공성 미세 구조는 가교제인 DSS와 효소분해효소(urease)의 처리가 진행되는 동안에도 지속적으로 유지되는 것을 알 수 있었다. 이 결과로부터 요소분해효소 고정화 과정이 다공성 미세 구조에는 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있으며, 요소분해효소  고정화 막이 유동 조건에서 효과적으로 전기 화학적 신호를 생성할 수 있음을 알 수 있다.

[0112] 또한, 원자 조성은 SEM에서 에너지 분산 분석법(EDS)을 사용하여 분석한다. PTFE 막은 불소로 포화된 알킬 사슬을 가지며, 탄소(40.7 %) 및 불소(59.3 %)를 나타내었다. 또한 파릴렌-A층이 코팅될 때, 질소(6.4 %)는 탄소(32.3 %) 및 불소 (61.3 %)의 존재 하에 나타나며, DSS 처리 후, 탄소 (41.4 %), 질소 (6.9 %) 및 불소 (40.9 %)에서 추가 산소(10.7 %)가 확인되었다. 이러한 산소는 DSS의 숙신이미딜기에서 유래한 것임을 알 수 있다. 요

소분해효소의 고정 후 탄소, 질소, 산소 및 불소의 원자 분포는 각각 30.7 %, 7.3 %, 11.9 % 및 50.1 %로 나타났다. DSS가 처리된 막과 비교해 보면 질소 및 산소의 원자 비가 증가되었다. 이는 다른 유기 중합체보다 상대적으로 많은 양의 질소와 산소를 함유한 요소분해효소가 성공적으로 고정화 되었다는 것을 의미한다.

[0114] 나아가 본 발명자들은 요소분해효소가 고정화된 막을 FT-IR을 사용하여 분석하였다.

[0115] 그 결과, 도 5a에 나타낸 바와 같이, 노출된 PTFE 막은 1201 nm 및 1153 nm에서 강한 $CF_2$ 연신 피크(stretching peaks)를 나타냈고, 파릴렌-A가 PTFE 막 상에 코팅되었을 때에는 방향족 C = C 연신 피크가 관찰되었다(도 5b 참조). 파릴 렌-A는 골격에 페닐기를 가지므로 이는 파릴렌-A가 PTFE 막에 성공적으로 코팅되었다는 것을 의미한다. DSS 처리 후, 숙신이미딜기 유래의 아미드 A 및 카보닐 C = O 스펙트럼은 각각 3400 nm 및 1730 nm에서 검출되었다(도 5c 참조). 또한, DSS의 간격부인 알킬 그룹으로부터 $CH_2$ 신장 피크는 2920 nm 및 2850 nm에서 관찰되었다. 이러한 결과는 DSS가 아민 활성화된 파릴렌-A 코팅된 PTFE 막에 성공적으로 고정되었음을 의미한다.

[0116] 도 5d에 나타낸 바와 같이, 요소분해효소 고정화 후, 요소분해효소의 펩티드 결합으로부터 다양한 유형의 아미드 피크, 아미드 A, 아미드 B, 아미드 I 및 아미드 II가 각각 3400 nm, 2920 nm, 1640 nm 및 1455 nm에서 관찰되었고, 이 결과로부터  요소분해효소가 PTFE 기반의 고체 지지체 상에 잘 고정되었음을 알 수 있고, 이러한 본 발명에 따른 요소분해효소가 고정화 된 막은 요소 바이오 센싱을 위한 유체 챔버에 통합되어 요소 바이오센서 또는 요소 바이오센서 시스템으로 사용 가능함을 알 수 있었다.

[0118] **<실시예 3>**

[0119] **요소분해효소 고정화 막을 이용한 요소 바이오센싱**

[0120] 도 1에 나타낸 바와 같이, 8 개의 요소분해효소 고정화 막을 PDMS 유체 챔버에 삽입하고 아민화된 유리질 탄소 전극을 상기 막 아래에 위치시켰다. 유체 시스템을 사용하여 PBS에 용해된 요소를 유체 챔버로 흘려주었고, 신호는 일정한 전압을 시간대 전류측정기(chronoamperometry)를 이용하여 측정하였다.

[0121] 요소분해효소로 가수 분해된 요소는 다음과 같은 반응에 의해 카르바민산 및 암모니아로 분해된다:

[0122] $(NH_2)_2CO + H2O \rightarrow NH_2COOH + NH_3$

[0124] 가수 분해 후, 불안정한 카르바민산은 이량체화 및 탈카르복실화에 의해 히드라진을 생성하였다. 이후, 히드라진으로부터 유리 질소를 생성함으로써 전극 산화가 일어났다. 본 발명에 따른 요소 바이오센서의 실시간 모니터링을 테스트하기 위해, 다양한 농도의 요소를 PBS에 첨가하고 1.0 mL $min^{-1}$의 유속으로 본 발명의 요소 바이오센서에 유입시켰다. 도 6a에 나타낸 바와 같이, 다양한 가교제가 처리된 막으로부터의 실시간 전기 화학적 신호는 시간대 전류측정기(chronoamperometry)로 측정하였다.

[0125] 가교제(DSG, DSS 및 $BS(PEG)_5$)가 처리된 모든 막에서 요소 농도를 증가시킴에 따라 센서 반응이 증가되는 것으로 나타났고, 대조군인 GA가 처리된 막(오렌지)보다 높은 전류를 나타냈다. 또한, 유동 상태에서도 전류 신호는 7 분 이내에 포화되었다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 요소 바이오센서가 유동 조건에서 요소 농도를 모니터링 할 수 있음을 나타내는 것이며, 가교제들 중에서도 특히 DSS가 처리된 막은(적색) 모든 요소 농도에서 가장 높은 전류 값을 보였다.

[0126] 이 결과는 마이크로 플레이트(도 2 참조)와 막(도 3 참조)을 기반으로 한 활성 분석 결과와도 일치한다. 따라서 본 발명에서 제조된 요소 바이오센서의 반응은 고정된 요소분해효소 활성에 비례하고, 고정화 후 요소분해효소 활성이 높으면 요소분해효소 기반 요소 바이오센서의 감도를 증가시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 한편, 물리적으로 흡착된 요소분해효소(바이올렛)가 고정된 막은 신호가 안정적이지 않았으며 요소 농도가 6mM 이상으로는 증가하지 않는 것으로 나타났다.

[0127] 또한, 비교적 낮은 요소 농도에서의 신호 포화는 물리적 흡착의 고정 용량이 공유결합에 의한 고정화보다 훨씬 낮으므로, 요소분해효소의 공유결합에 의한 고정화가 유동 조건에서 요소의 실시간 모니터링에 적합함을 알 수 있다. 요소분해효소 처리가 없는 음성 대조군인 파릴렌-A 코팅된 PTFE 막(검정색)은 요소 시료가 유동하는 동안

전기 화학적 신호가 생성되지 않았다. 따라서 요소분해효소의 존재 하에서만 전기화학 신호가 생성될 수 있으며, 요소만으로는 노이즈 신호를 생성할 수 없다는 것을 알 수 있었다.

[0128] 또한 도 6b에 나타낸 바와 같이, 전류 값은 1mM 내지 8mM의 요소 농도에 대해 측정하였는데, 모든 요소분해효소 고정화 막(DSG (●), DSS (■), $BS(PEG)_5$ (▲), GA (▼) 및 물리적 흡착 (◆)) 기반의 요소 바이오센서는 각각 0.97, 0.99, 0.99, 0.99 및 0.99로 양호한 R-제곱 값의 선형을 나타냈다.

[0129] 음성 대조군의 경우, R- 제곱 값이 0.66으로 선형이 불량한 것으로 나타났다. 검출한계 (LOD)는 3-시그마 신뢰 구간을 사용하여 선형 그래프로부터 계산하였다. DSG, DSS, $BS(PEG)_5$, GA 및 물리적 흡착에 대한 각각의 LOD는 1.3, 1.1, 1.3, 1.5 및 1.6 mM로 계산되었다.

[0130] 한편, 혈액 내 요소의 정상 범위는 1.2 ~ 3.3 mM이며(Dabla 2010; Lin et al. 2004), 혈청에서 요소의 농도 감소는 일반적이지 않다. 따라서 DSS 처리된 본 발명의 고정화 막의 LOD는 임상 시료에서 요소 농도를 모니터링하기에 적합하다는 것을 알 수 있었다.

[0131] 물리적 흡착을 제외하고, 공유 결합으로 요소분해효소가 고정화된 모든 막은 20 mM까지 요소 농도의 단일 증가를 나타냈다. 이는 요소 바이오센싱의 포화 농도가 20mM 보다 높다는 것을 의미한다. 따라서 요소분해효소 고정화 막 기반의 요소 바이오센서의 동적 범위는 LOD에서부터 20mM까지 임을 확인하였고, 보통 신부전의 경우, 혈액의 요소 농도는 10mM 보다 높은 것으로 알려져 있다. 만일 본 발명의 요소 유체 센서를 사용하여 시험 대상자의 생리액 요소 농도를 모니터링하는 경우,, 요소 센서 농도가 10mM 보다 높게 측정되면 정상 범위를 벗어나기에 의학적 치료가 필요하다고 진단할 수 있다. 따라서 본 발명의 바이오센서의 동적 범위는 유동 상태의 생리학적 유체에서 요소를 모니터링하기에 적합하며, 요소 관련 질환의 발병가능성 및 진행 상태를 검출 및 진단하는데도 유용하게 사용할 수 있다.

[0132] 또한 DSG, DSS, $BS(PEG)_5$, GA 및 물리적 흡착에 상응하는 감도는 각각 1.5, 3.4, 1.6, 1.1 및 0.9 mA $M^{-1}$ $cm^{-2}$ 인 것으로 측정되었고, 이 결과는 마이크로 플레이트(도 2)와 막(도 3)을 기반으로 한 활성 분석 결과와도 일치한다. 이는 본 발명에서 선택하여 사용한 가교제(DSS)가 일반적으로 사용되고 있는 GA 가교제에 비해 전기 화학적 효소 기반의 바이오센서 감도가 3배 이상으로 우수하다는 것을 알 수 있었고, 가교제의 높은 고정 효율이 효소 기반의 전기 화학적 바이오센서의 민감도를 향상시키는데 크게 기여한다는 것을 알 수 있었다.

[0134] **<실시예 4>**

[0135] **본 발명의 바이오센서를 이용한 혈청 시료 내 요소 농도의 측정**

[0136] 본 발명자들은 본 발명에서 제조한 DSS 가교제를 이용하여 요소분해효소를 고정화시킨 고정화 막이 구비된 유동 요소 바이오센서로 인간 혈청 시료에 함유된 요소 검출이 가능한지를 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

[0137] 요소가 함유된 혈청 시료를 1.0 mL $min^{-1}$의 유속으로 본 발명의 바이오센서에 흘려주었고, 실시간 전기 화학 신호를 시간대 전류측정기(chronoamperometry)로 측정하였다.

[0139] 그 결과 도 7에 나타낸 바와 같이, 수천 개의 단백질을 함유한 생리학적 유체(혈청)에 대한 측정 결과는, 요소 농도의 증가에 따라 센서 반응도 증가하는 것으로 관찰되었다. 혈청 시료로부터의 센서 신호는 서로 다른 요소 농도 간에 명확한 신호 차이를 보이는 것으로 나타났다.

[0140] 이는 DSS 가교제를 이용하여 제조된 본 발명의 바이오센서가 유동 조건 하에서도 실제적인 생리학적 시료를 대상으로 요소를 신속하고 정확하게 모니터링할 수 있음을 의미한다.

[0141] 전류 값을 분석한 도 7b의 결과를 보면, 요소 농도에 대한 전류값의 측정이 1mM 내지 8mM의 요소 농도 범위에서 0.99의 R- 제곱 값으로 우수한 선형의 그래프를 보였다. 또한, LOD는 1.2 mM 인 것으로 측정되었고, DSS 가교제 기반의 요소 바이오센서의 동적 범위는 1.2 mM 내지 20 mM 인 것으로 확인되었다. 따라서 본 발명의 요소 바이오센서는 유동 상태에서 실제 환자 혈청 시료를 대상으로 요소 측정을 실시간으로 모니터링할 수 있다.

[0142] 또한, 혈청 내 요소의 바이오 센싱 감도는 1.6 mA $M^{-1}$ $cm^{-2}$ 인 것으로 계산되었다. 이 결과는 GA 가교제 결합 요소 바이오 센싱의 감도 보다도 높다. 즉, 본 발명에 따른 DSS 가교제에 기초한 요소 바이오센서가 기존 효소 고

정 바이오센서보다 더 높은 감도로 시료 내 요소 농도를 유동 조건 하에서 모니터링 할 수 있음을 의미하며, 특히 가교제 중에서 DSS가 요소 바이오센서의 성능을 향상시킬 수 있고, 유동 상태에서 생리학적 유체 내에 함유된 요소의 농도를 효과적으로 모니터링할 수 있음을 알 수 있었다.

[0144] **<실시예 5>**

[0145] **재현성 및 간섭 분석(Repeatability and interference analysis)**

[0146] 서로 다른 종류의 가교제를 이용하여 제조한 요소 바이오센서에 대한 재현성 분석은 10mM 요소의 3회 연속 측정에 따라 수행하였다. 도 8에 나타낸 바와 같이, PBS 중의 10mM 요소가 20 분 동안 바이오센서에 유입된 후, PBS를 20 분 동안 흘려주었다. 모든 측정에서, 10mM 요소가 흐를 때 전기 화학적 신호가 증가하였고 블랭크 샘플(PBS)이 흐를 때에는 신호가 즉시 감소하는 것으로 나타났다. 3 회 반복 측정에서 DSG (파란색), DSS (빨간색), DS(PEG)$_5$ (녹색) 및 GA(검정) 처리군의 상대 표준 편차 (RSD)는 3.7, 0.7, 3.2 및 6.0 %로 측정되었다. 모든 디숙신이미딜 기반의 가교제들은 5 % 미만의 재현성을 나타내었고, GA는 가교제 중에서 가장 높은 수치를 나타내어, 이를 통해 본 발명에서 선택하여 사용한 디숙신이미딜 가교제가 현재 널리 사용되는 GA 가교제보다 측정의 신뢰성이 더 높음을 알 수 있었다. 또한, 디숙신이미딜 가교제 중에서, DSS는 특히 1 % 미만, 0.7%의 가장 낮은 RSD 값을 나타냄으로써, DSS는 유동 조건에서 민감하고 신뢰할 수 있는 요소 실시간 모니터링을 위한 요소분해효소의 고정화에 가장 효과적임을 확인하였다.

[0148] 또한, 간섭 분석을 위해, 2 μM 요산, 30 μM 글루코스, 2 μM 글리신, 3mM 염화나트륨 및 50 μM 수크로스의 서로 다른 유기종 및 이온종을 10mM 요소가 함유된 PBS 용액에 첨가하고 바이오센서에 유입시켰다. 10mM 요소를 흘려보낸 후, 시간에 따른 전류값을 측정하였는데, 도 9에 나타낸 바와 같이, 가시적인 응답 변화는 검출되지 않았다. 시간대 전류측정기(chronoamperometry)로 측정한 요산, 글루코스, 글리신, 염화나트륨 및 수크로스 첨가에 의한 신호 변화는 각각 0.3, 2.3, 3.4, 3.0 및 4.4 %로 나타났으며, 5 % 미만의 간섭은 유동 상태의 생리학적 유체에서 요소에 대한 DSS 기반의 요소 바이오센서가 우수한 선택성이 있음을 의미한다. 따라서 이러한 결과로부터 본 발명자들은 DSS 가교제를 이용하여 개발된 본 발명의 요소 바이오센서가 향상된 감도(sensitivity), 재현성(repeatability) 및 선택성(selectivity)을 가지며, 유동의 조건하에서도 생리학적 유체 내의 요소 농도를 효율적으로 모니터링할 수 있음을 알 수 있었다.

[0150] **<결론>**

[0151] 본 발명에서는 유동 조건에서 전기 화학적 신호의 생성을 위해 요소분해효소 고정화 막을 기반으로 하여 폭 2 cm, 길이 3.5 cm 및 높이 1.5 cm인 휴대용 요소 바이오센서를 개발하였다. 요소분해효소를 지지체 상에 효율적으로 고정하기 위해, 디숙신이미딜 기반의 가교제로서 DSG, DSS 및 BS(PEG)$_5$를 이용하였다. 마이크로 플레이트 및 막(membrane)에 기초한 요소분해효소의 활성 분석으로부터 가교제 종류 중에서 DSS가 가장 높은 요소분해효소의 고정 효율을 보였다.

[0152] 또한, 요소분해효소의 고정화 과정은 SEM 및 FT-IR 분석에 의해 확인되었고, 요소분해효소 고정 PTFE 막은 다공성 미세 구조를 유지하는 것으로 확인되었고, 요소분해효소는 가교제에 의해 파릴렌-A 코팅된 다공성 막에 공유결합으로 고정화되었다. 요소분해효소 고정화 막을 전극 상에 놓고 PDMS 유체 챔버에 삽입한 다음, 요소 시료를 본 발명에서 제조된 요소 바이오센서 상에 유동시켜 요소 검출 신호를 측정하였다. 그 결과, DSG, DSS, BS(PEG)$_5$ 및 GA를 이용한 각 실험에 따른 감도는 각각 1.5, 3.4, 1.6 및 1.1 mA $M^{-1}$ $cm^{-2}$ 으로 측정되었고, 이 결과로부터 DSS가 가장 효과적인 가교제임을 알 수 있었으며, 실제 인간 혈청에 첨가된 요소 시료를 이용한 경우, 시료에 첨가된 요소를 실시간 모니터링할 수 있음을 알 수 있었다. 이때, 측정 감도는 1.6 mA $M^{-1}$ $cm^{-2}$ 인 것으로 계산되었다.

[0153] 또한, 본 발명의 요소 바이오센서에 대한 재현성 분석 결과, 1 % 미만으로 확인되었고, 상이한 유기 및 이온 종으로부터의 간섭은 5 % 미만으로 확인되었다. 따라서 본 발명의 DSS 가교제 기반의 요소 바이오센서는 향상된 감도, 재현성 및 선택성을 가지며, 유동적인 생리학적 유체를 대상으로 요소 농도를 효율적으로 모니터링할 수

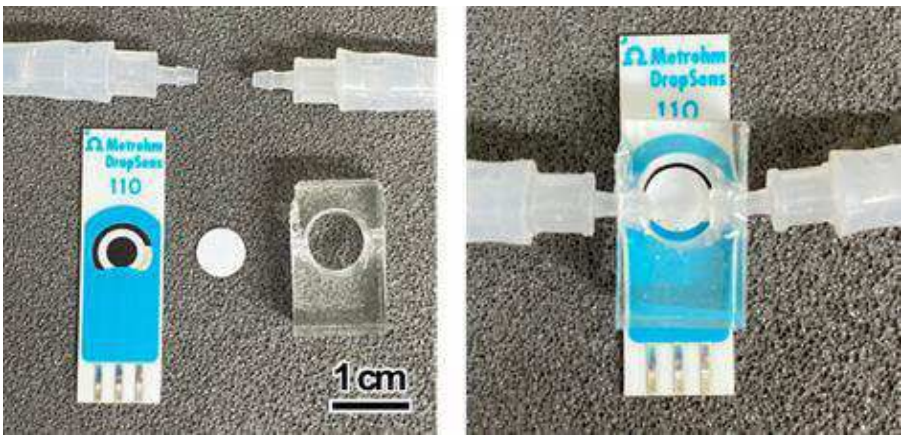
있음을 알 수 있었다.

[0154] 그러므로 유동 조건에서 사용 가능한 본 발명의 휴대용 요소 바이오센서는 현장 검사, 휴대용 투석 시스템과 같은 실시간 모니터링 시스템 및 인공 신장 등을 포함한 휴대용 애플리케이션에 모두 활용 가능함을 알 수 있었다.

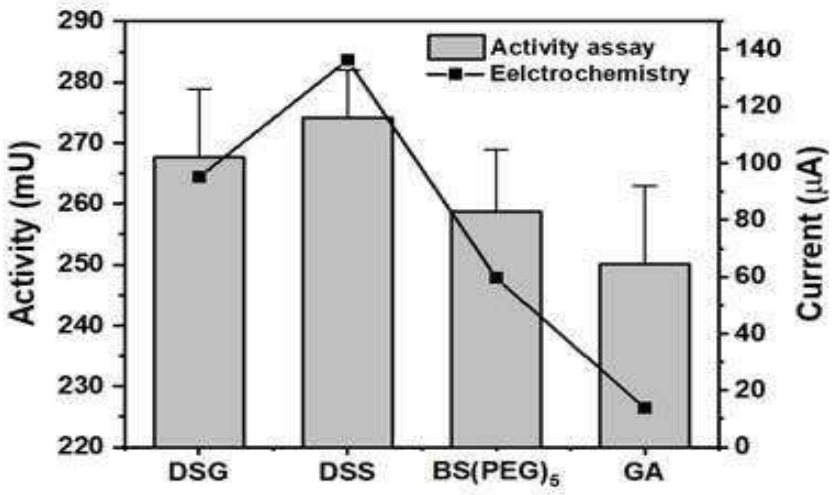
[0156] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

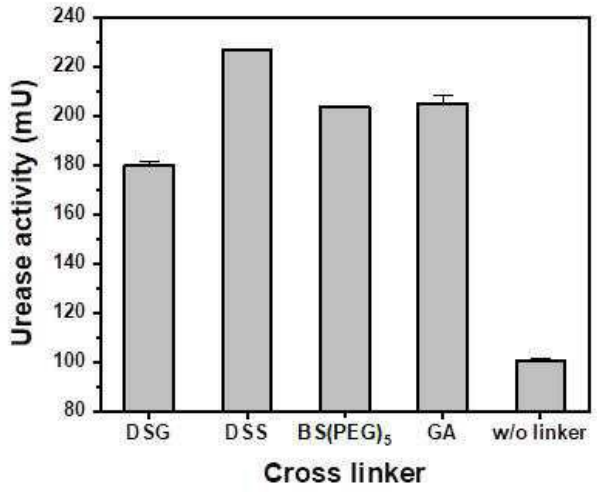
### 도면1



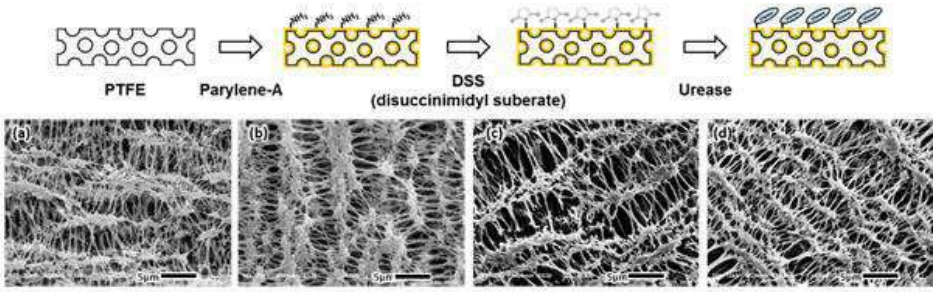

### 도면2



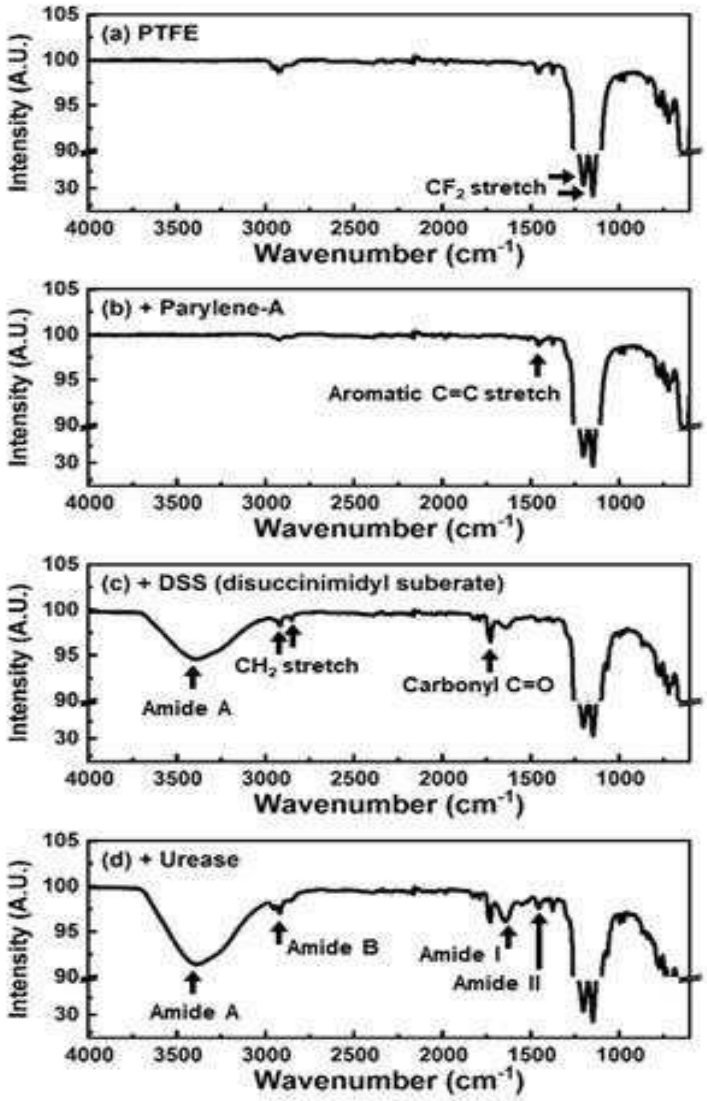
도면3


Urease activity (mU)
240
220
200
180
160
140
120
100
80
DSG
DSS
BS(PEG)5
GA
w/o linker
Cross linker

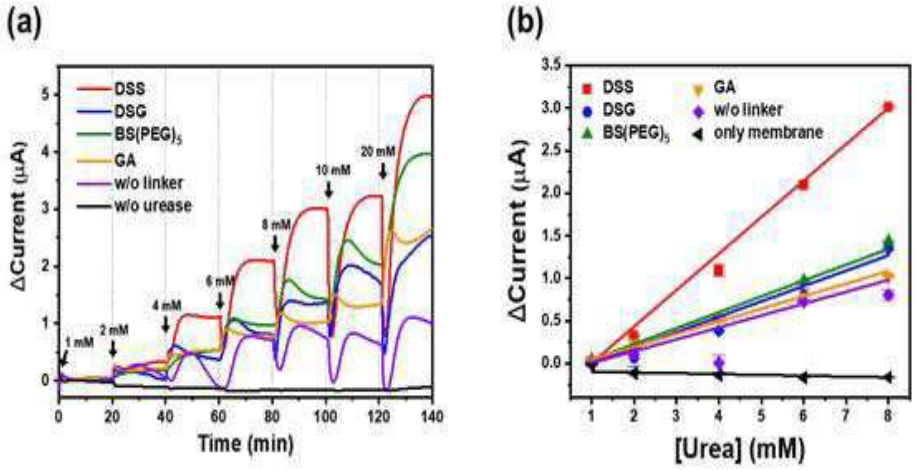
도면4


PTFE
Parylene-A
DSS
(disuccinimidyl suberate)
Urease
(a)
(b)
(c)
(d)

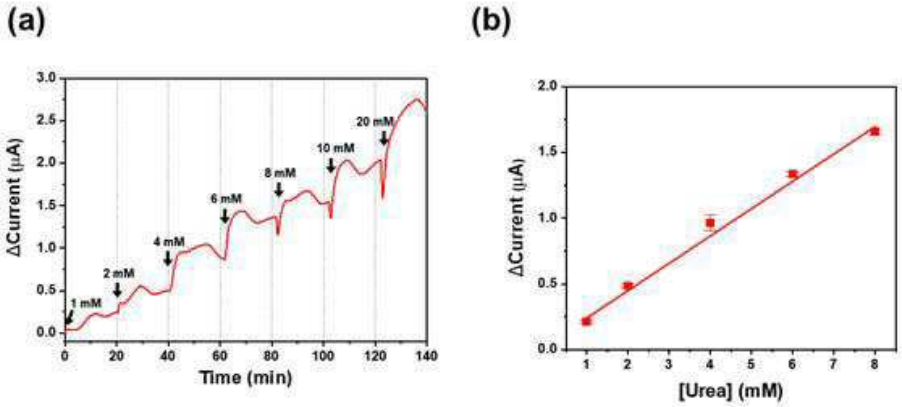
도면5


(a) PTFE
CF2 stretch
(b) + Parylene-A
Aromatic C=C stretch
(c) + DSS (disuccinimidyl suberate)
CH2 stretch
Amide A
Carbonyl C=O
(d) + Urease
Amide B
Amide I
Amide II
Amide A
Intensity (A.U.)
Wavenumber (cm-1)

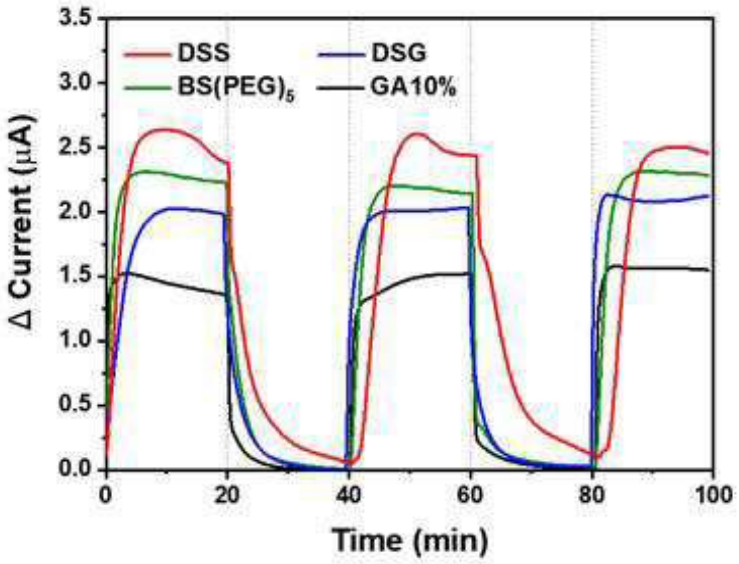
도면6


(a)
DSS
DSG
BS(PEG)5
GA
w/o linker
w/o urease
1 mM
2 mM
4 mM
6 mM
8 mM
10 mM
20 mM
ΔCurrent (μA)
Time (min)
(b)
DSS
DSG
BS(PEG)5
GA
w/o linker
only membrane
ΔCurrent (μA)
[Urea] (mM)

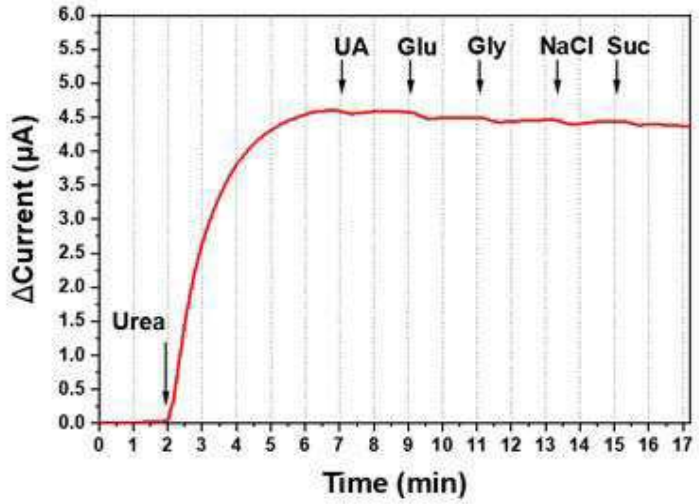
도면7


(a)
(b)
ΔCurrent (μA)
Time (min)
1 mM
2 mM
4 mM
6 mM
8 mM
10 mM
20 mM
[Urea] (mM)

도면8

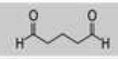
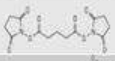

DSS
DSG
BS(PEG)5
GA10%
Δ Current (μA)
Time (min)

도면9




도면10

(a)

| Chemical | Structure | Atomic spacing (Å) |
|---|---|---|
| Glutaraldehyde |  | 5.00 |
| DSG (Disuccinimidyl glutarate) |  | 7.7 |
| DSS (Disuccinimidyl suberate) |  | 11.4 |
| $BS(PEG)_5$ (PEGylated bis(sulfoscuccinimidyl)suberate) |  | 21.7 |

(b)

