



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0044280

(43) 공개일자 2015년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0123491

(22) 출원일자 2013년10월16일

심사청구일자 2013년10월16일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 11호 12 (송도동)

(72) 발명자

김규원

인천 연수구 청능대로 124, 117동 104호 (동춘동, 금호동아아파트)

최동철

서울 도봉구 방학로11길 36, 1동 801호 (방학동, 벽산아파트)

(74) 대리인

차준용

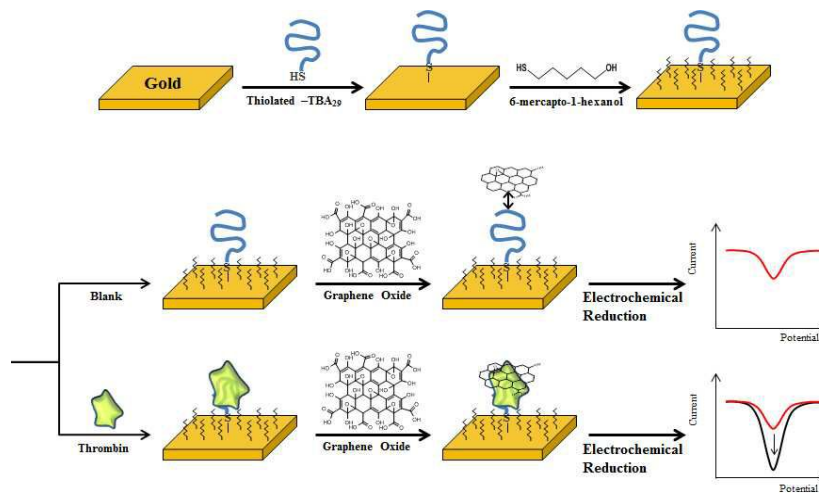
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물을 이용한 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서는 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물과 표적물질의 직접적인 결합을 이용함으로써 표적물질에 대한 민감도 및 선택도가 우수하여 표적물질의 농도 분석이 용이하고, 상기 바이오센서를 이용하여 표적물질을 검출하는 경우, 단순하고 경제적인 방법으로 우수한 표적물질 검출 효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-0017219

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업 중견 핵심연구

연구과제명 트롬빈의 효소반응을 이용한 초고감도 타겟검출법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인천대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

표적물질-특이적 압타머(specific aptamer)가 전극에 고정되어 있고, 상기 고정된 표적물질-특이적 압타머와 표적물질이 결합하여 형성된 압타머에 결합된 표적물질을 포함하며,

상기 표적물질은 그래핀 산화물과 직접적으로 결합하는 것을 특징으로 하고, 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물을 전기화학적으로 환원시켜 환원 전류를 측정함으로써 표적물질의 농도를 측정하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 표적물질은 물리적 또는 화학적 상호작용에 의해 그래핀 산화물과 결합하는 생체 내 물질인 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 표적물질은 금속 이온, DNA, RNA, ATP 및 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 단백질은 트롬빈(thrombin), 피브리노겐(fibrinogen), 면역글로불린 G(immunoglobulin G, IgG), 면역글로불린 M(IgM), 면역글로불린 A(IgA), 면역글로불린 D(IgD), 헤모글로빈(hemoglobin), 미오글로빈(myoglobin), 알부민(albumin), 카제인(casein), 프롤라민(prolamin), 액틴(actin), 미오신(myosin), 콜라겐(collagen), 및 케라틴(keratin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 표적물질-특이적 압타머는 압타머의 5'-말단에 티올기(thiol group)를 갖는 DNA 또는 RNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 표적물질-특이적 압타머는 5'-Thiol(C₆)-TTT TTA GTC CGT GGT AGG GCA GGT TGG GGT GAC T-3'인 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 전극은 금, 은, 구리, 백금 탄소, 인듐 주석 산화물(Indium Tin Oxide, ITO) 및 알루미늄으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 표적물질과 그래핀 산화물의 결합은 정전기적 인력 또는 π - π 상호작용에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 그래핀 산화물을 포함하는 용액의 pH는 4 내지 6인 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물의 환원 전류는 순환전압전류법 또는 전기화학 임피던스 분광법으로 측정하는 것을 특징으로 하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서.

청구항 11

- 1) 전극에 표적물질-특이적 압타머(specific aptamer)를 고정화하는 단계;
- 2) 상기 표적물질-특이적 압타머가 고정된 전극에 6-머캅토-1-헥산올을 가하여 6-머캅토-1-헥산올을 전극에 결합시키는 단계;
- 3) 상기 표적물질-특이적 압타머 및 6-머캅토-1-헥산올이 고정화된 전극에 표적물질을 포함하는 용액을 가하여 표적물질을 압타머에 결합하는 단계;
- 4) 상기 압타머에 결합된 표적물질에 그래핀 산화물을 결합시키는 단계; 및
- 5) 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물을 전기화학적으로 환원시켜 환원 전류를 측정하는 단계를 포함하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질의 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물을 이용한 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 전극에 결합된 표적물질에 그래핀 산화물을 직접적으로 결합하고, 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물을 전기화학적으로 환원시켜 환원 전류를 측정함으로써 표적물질의 농도를 측정하는, 표적물질 검출용 바이오센서 및 이의 제조 방법에 관한 것입니다.

배경 기술

[0002]

일반적으로 생체 내 존재하는 표적물질로는 금속 이온, DNA, RNA, ATP 및 단백질 등이 있다. 상기 단백질 중 트롬빈은 혈액 내에 존재하는 단백질로서 혈액 응고 기작에서 중요하게 작용하는 단백질이다. 그러나, 혈중 정상적으로 존재하는 트롬빈의 농도를 벗어난 경우, 질병을 초래하는 사례가 보고되어 있고(J. Bichler, J. A. Heit, W. G. Owen, Thromb. Res. 84 (1996) 289-294), 이에 따라 용이한 트롬빈의 농도 측정법이 요구되고 있다.

[0003]

종래의 트롬빈 농도 측정을 위해서는 트롬빈에 정량적으로 1:1 반응하는 히루딘 펩타이드를 이용한 면역 측정법이 사용되었다. 이 때 형성된 트롬빈-히루딘 복합체를 ELISA 검사법이나 친화 크로마토그래피를 통해 트롬빈의 농도를 검출할 수 있다. 그러나, 이 방법은 히루딘의 경우, 생체 외에서 다른 단백질과 공유 결합한 트롬빈과는 결합할 수 없다는 단점이 있다. 또한, 현재 생체 시료 내의 단백질 농도 측정을 위해 주로 사용되는 기술인 면역반응에 기초를 둔 ELISA 검사법의 경우 안정성이 떨어지는 단백질을 사용하기 때문에 센서에 적용할 경우 보관에 특별한 주의가 요구될 뿐 아니라 광학적 분석에 기반을 두고 있으므로 분석 장비가 매우 고가라는 단점이 있다.

[0004]

또한, 클락형(Clack-type) 포도당 센서의 출현 이후로, 전기화학적 바이오센서는 그 간단성, 민감도, 선택도, 및 경제성 때문에 질병의 진단, 음식의 분석, 환경의 관찰 및 분석의 분야에서 우수한 분석 기술로 발전되어 왔다. 또한, 다른 바이오센서에 비해서 그 성능의 저하 없이도 소형화를 할 수 있다는 장점이 있다. 새로운 바이오센서의 플랫폼과 전략을 이용하여 전기화학적 바이오센서의 민감도와 선택도 등을 더욱 향상시키기 위한 연구가 진행되고 있다. 그 중에서도 그래핀을 이용한 바이오센서의 플랫폼에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0005]

그래핀은 탄소원자들이 2차원 상에서 sp^2 결합에 의한 벌집 모양의 배열을 이루면서 원자 한 층의 두께를 가지는 반금속성 나노 물질로, 일반적인 탄소 구조체에 비하여 넓은 비표면적($2,630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)을 가지고 있다. 또한, 구조적 및 화학적으로 매우 안정할 뿐만 아니라, 전기 및 열전도도가 우수하여 전자 소자, 센서, 슈퍼 캐패시터, 태양전지, 및 방열소재 등에 응용이 가능한 물질로 알려져 있다.

[0006]

또한, 그래핀 산화물(Graphene Oxide, GO)과 전기화학적으로 환원된 그래핀 산화물(Electrochemically Reduced Graphene Oxide, ERGO)은 바이오센서의 구성물, 세포 이미징(cellular imaging), 약물 전달 등에 있어서 활용

가능성이 높은 물질로 알려져 있다. 이들은 기존의 그래파이트보다 매우 큰 표면적을 가지며, 높은 전기전도도 및 강력한 기계적 강도를 가진다. 또한 부서지기 쉬운 그래파이트보다 유연하여, 유연성이 필요한 전기제품 등에 대해서 장점을 가지며, 더 많은 균일하게 분포된 전기화학적 활성사이트를 가지기 때문에 우수한 전극 표면 재료라는 평가를 받고 있다.

[0007] 따라서, 이러한 그래핀 산화물을 이용하여 전기화학적으로 트롬빈을 검출하는 방법에 대한 연구의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서에 대해 탐색하던 중, 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물을 이용하는 경우, 그래핀 산화물과 표적물질의 직접적인 결합에 의해 표적물질 검출에 있어서 민감도 및 선택도가 우수하여짐을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명은 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물과 표적물질의 직접적인 결합을 이용한 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서 및 이의 제조 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물과 표적물질의 직접적인 결합을 이용한 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서 및 이의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서는 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물과 표적물질의 직접적인 결합을 이용함으로써 표적물질에 대한 민감도 및 선택도가 우수하여 표적물질의 농도 분석이 용이하고, 상기 바이오센서를 이용하여 표적물질을 검출하는 경우, 단순하고 경제적인 방법으로 우수한 표적물질 검출 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따른 생체 내 표적물질 중 트롬빈의 검출 방법의 개략적인 과정을 나타내는 도이다.

도 2는 그래핀 산화물 용액의 pH에 따른 트롬빈이 결합된 전극과 블랭크(blank) 전극간의 환원 전류의 차이를 나타내는 도이다.

도 3은 금 전극, 금/압타머 전극, 금/압타머/트롬빈 전극, 및 금/압타머/트롬빈/그래핀 산화물 전극에 대한 (a) 전기화학 임피던스 분광법, 및 (b) 순환전압전류법의 측정 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 트롬빈 농도에 따른 (a) 순환전압전류법의 측정 결과, 및 (b) 환원 전류 값의 변화를 나타내는 도이다.

도 5는 트롬빈, ADH, Avidin, Rabbit-IgG, 및 Myoglobin의 다양한 단백질의 종류에 따른 (a) 순환전압전류법의 측정 결과, 및 (b) 환원 전류 값의 변화를 나타내는 도이다.

도 6은 트롬빈 용액에 (a) 담그기 전, 및 (b) 담근 후의 그래핀 산화물 처리된 전극 표면의 주사 전자 현미경(SEM) 이미지를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 표적물질-특이적 압타머(specific aptamer)가 전극에 고정되어 있고, 상기 고정된 표적물질-특이적 압타머와 표적물질이 결합하여 형성된 압타머에 결합된 표적물질을 포함하며,

[0014] 상기 표적물질은 그래핀 산화물과 직접적으로 결합하는 것을 특징으로 하고, 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물을 전기화학적으로 환원시켜 환원 전류를 측정함으로써 표적물질의 농도를 측정하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질 검출용 바이오센서를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은

- [0016] 1) 전극에 표적물질-특이적 압타머(specific aptamer)를 고정화하는 단계;
- [0017] 2) 상기 표적물질-특이적 압타머가 고정된 전극에 6-머캅토-1-헥산올을 가하여 6-머캅토-1-헥산올을 전극에 결합시키는 단계;
- [0018] 3) 상기 표적물질-특이적 압타머 및 6-머캅토-1-헥산올이 고정화된 전극에 표적물질을 포함하는 용액을 가하여 표적물질을 압타머에 결합하는 단계;
- [0019] 4) 상기 압타머에 결합된 표적물질에 그래핀 산화물을 결합시키는 단계; 및
- [0020] 5) 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물을 전기화학적으로 환원시켜 환원 전류를 측정하는 단계를 포함하는, 그래핀 산화물을 이용한 표적물질의 검출 방법을 제공한다.
- [0021] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명에 따른 그래핀 산화물을 이용한 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서는, 전극에 결합된 표적물질에 그래핀 산화물이 직접적으로 결합하고, 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물을 전기화학적으로 환원시켜 환원 전류를 측정함으로써 표적물질의 농도를 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 상기 표적물질은 생체 내 존재하는 물질로, 그래핀 산화물과 물리적 또는 화학적 상호작용에 의해 결합할 수 있는 물질이라면 제한 없이 검출될 수 있다. 즉 표적물질은 생체 내 존재하는 금속 이온, DNA, RNA, ATP 및 단백질 등과 같은 화학 또는 바이오 물질을 일컫는다.
- [0024] 상기 단백질로는 트롬빈(thrombin), 피브리노젠(fibrinogen), 면역글로불린 G(immunoglobulin G, IgG), 면역글로불린 M(IgM), 면역글로불린 A(IgA), 면역글로불린 D(IgD), 헤모글로빈(hemoglobin), 미오글로빈(myoglobin), 알부민(albumin), 카제인(casein), 프롤라민(prolamin), 액틴(actin), 미오신(myosin), 콜라겐(collagen), 및 케라틴(keratin) 등 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 일반적으로 "압타머"란 검출하고자 하는 표적물질과 특이적으로 결합할 수 있는 압타머를 의미하는데, 본 발명에서는 상기 표적물질과 특이적으로 결합하는 압타머를 사용하였다.
- [0026] 상기 표적물질-특이적 압타머는 표적물질과 선택적으로 결합하는 DNA, RNA 서열이라면 무엇이든지 가능하며, 표적물질과의 결합 효율을 높이기 위해, 탄소 6개를 추가적으로 포함할 수도 있다. 특히, 금 전극 표면에 고정을 위하여 표적물질-특이적 압타머의 5'-말단에 티올기(thiol group)를 추가할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 표적물질-특이적 압타머로서 트롬빈과 특이적으로 결합하는 5'-Thiol(C₆)-TTT TTA GTC CGT GGT AGG GCA GGT TGG GGT GAC T-3'을 사용하였다.
- [0027] 상기 전극은 해당 분야에서 일반적으로 사용되는 것이라면 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 전극은 금, 은, 구리, 백금 탄소, 인듐 주석 산화물(Indium Tin Oxide, ITO) 및 알루미늄 등을 포함할 수 있으며, 본 발명에서는 금 전극이 바람직하다.
- [0028] 상기 표적물질과 그래핀 산화물의 결합은 정전기적 인력 또는 $\pi-\pi$ 상호작용에 의해 수행될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 상기 그래핀 산화물을 포함하는 용액의 pH는 4 내지 6인 것이 바람직하고, 본 발명에서는 5인 것이 더욱 바람직하다. 상기 pH 5에서 그래핀 산화물의 산소기(oxygen group)들이 탈양성자화(deprotonation)되어 음전하를 띠는 표적물질-특이적 압타머와의 정전기적 반발력은 증가시키고, 표적물질과의 정전기적 상호 작용이 지배적으로 되기 때문이다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 그래핀 산화물을 이용한 표적물질의 농도 측정은, 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물의 양을 측정하는 것을 의미하며, 상기 표적물질에 결합된 그래핀 산화물의 양은 그래핀 산화물을 전기화학적으로 환원시켜 환원 전류를 측정함으로써 수행될 수 있다.
- [0031] 상기 환원 전류를 측정하기 위해서, 순환전압전류법 또는 전기화학 임피던스 분광법을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 따른 그래핀 산화물을 이용한 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서는 표적물질의 농도가 증가할수록 순환전압전류법에서의 그래핀 산화물의 환원 피크 전류가 더욱 증가하므로 비교적 정확한 표적물질의 농도를 측

정할 수 있다. 또한, 본 발명의 바이오센서는 pH 5의 환경에서 표적물질 검출이 가장 최적화된다.

[0033]

상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 생체 내 표적물질 검출용 바이오센서는 전기화학적 표지자로서 그래핀 산화물과 표적물질의 직접적인 결합을 이용함으로써 표적물질에 대한 민감도 및 선택도가 우수하여 표적물질의 농도 분석이 용이하고, 상기 바이오센서를 이용하여 표적물질을 검출하는 경우, 단순하고 경제적인 방법으로 우수한 표적물질 검출 효과를 나타낸다.

[0034]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0035]

실시예 1. 그래핀 산화물을 이용한 트롬빈의 검출

[0036]

1-1. 금 전극 표면에 티올화 트롬빈 결합 압타머(thiolated thrombin binding aptamer, TBA)의 고정화

[0037]

표면 개질에 앞서, 금으로 코팅된 유리전극을 piranha 용액($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$)으로 세척한 뒤, 물로 세척하고 질소 기체로 건조하였다. 이후, 상기 세척된 금 전극을 10 nM의 티올화 트롬빈 결합 압타머(thiolated thrombin binding aptamer, 5'-Thiol(C_6)-TTT TTA GTC CGT GGT AGG GCA GGT TGG GGT GAC T-3') 및 1mM의 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)에 담그어 트롬빈 결합 압타머를 금 전극에 고정화하였다. 금 전극에 압타머를 고정화한 후에, 상기 전극을 1mM의 6-머캅토-1-헥산올에 1시간 동안 담그어 6-머캅토-1-헥산올을 금 전극에 결합하였다.

[0038]

1-2. 트롬빈 및 그래핀 산화물의 결합

[0039]

개질된 전극을 다양한 농도의 트롬빈 용액에 1.5시간 동안 담그어 트롬빈을 전극에 결합하였다. 그래핀 산화물(Graphene Oxide, GO)은 그래파이트 분말로 수정된 Hummers 방법(W. Hummers, R. Offeman, Journal of the American Chemical Society 80 (1958) 1339.)을 이용하여 제조하였다. 제조된 그래핀 산화물을 초음파 분산기로 1시간 동안 초음파 처리한 뒤, 450 nm 컷오프(cut-off) 막 유리 필터로 걸렀다. 그래핀 산화물 용액의 pH는 HCl 및 NH_4OH 를 이용하여 조정하였다. 이후, 상기 트롬빈이 결합된 전극 표면을 상기 0.1 mg/ml의 그래핀 산화물 용액에 50분 동안 담그어 트롬빈 표면 위에 그래핀 산화물을 결합시켰다. 상기 그래핀 산화물이 결합된 전극에 대하여 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) 및 순환전압전류법(Cyclic voltammetry, CV)을 수행하여 환원 전류를 측정하였다.

[0040]

본 발명에 따른 생체 내 표적물질 검출 방법의 개략적인 과정을 도 1에 나타내었다.

[0041]

실험예 1. 전기화학 임피던스 분광법 및 순환전압전류법 측정

[0042]

상기 실시예 1에 따라, 트롬빈 결합 압타머가 결합된 전극에 트롬빈을 결합하고, 그래핀 산화물을 가하여 제조한 전극에 대하여 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) 및 순환전압전류법(Cyclic voltammetry, CV)을 측정하였다. 전기화학 임피던스 분광법 및 순환전압전류법은 각각 PC와 연결된 일정 전위기(potentiostat)로 Ivium compactstat를 이용하여 수행하였다. 전기화학적 셀에서 Ag/AgCl에 연결된 작업 전극은 개질된 금 전극, 및 백금 와이어가 각각 사용된 기준 전극과 상대전극으로 구성되었다.

[0043]

전기화학 임피던스 분광법은 PBS 내의 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 mM, 1:1 분자비)의 형식전위(formal potential)에서 10 kHz 및 0.05 Hz 사이에서 측정하였다. 랜들(Randle) 등가회로는 나이퀴스트 플롯으로 나타난 임피던스 스펙트럼을 피팅하는데 사용되었다.

[0044]

1-1. 그래핀 산화물 용액의 pH 최적화

[0045]

실시예 1에 따른 트롬빈의 검출 효율을 높이기 위하여 그래핀 산화물 용액의 pH를 최적화 하였다. 그래핀 산화물 용액의 pH에 따른 트롬빈이 결합된 전극과 블랭크(blank) 전극간의 순환전압전류법에 의한 환원 전류의 차이

를 도 2에 나타내었다.

[0046] 도 2에 나타난 바와 같이, 그래핀 산화물 용액의 pH가 5인 경우 가장 큰 환원 전류 값의 차이를 나타내었다. 이것은 pH가 5에서 그래핀 산화물의 산소기(oxygen group)들이 탈양성자화(deprotonation)되어 음전하를 띠는 트롬빈 결합 압타머와의 정전기적 반발력은 증가시키고, 트롬빈과의 정전기적 상호 작용이 지배적으로 되기 때문이다.

[0047] 1-2. 전극의 제조 단계별 평가

[0048] 금 전극, 금/압타머 전극, 금/압타머/트롬빈 전극, 및 금/압타머/트롬빈/그래핀 산화물 전극에 대한 전기화학 임피던스 분광법(EIS) 및 순환전압전류법(CV)의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0049] 도 3(a)에 나타난 바와 같이, 금/압타머/트롬빈/그래핀 산화물 전극에서 산화환원 쌍(redox couple)의 전하 이동 저항값(charge transfer resistance)이 가장 크게 측정되었으며, 도 3(b)에 나타난 바와 같이, 금/압타머/트롬빈/그래핀 산화물 전극에서 가장 큰 환원 피크 분리를 나타내었다.

[0050] 상기 결과로부터, 금 전극, 금/압타머 전극, 금/압타머/트롬빈 전극, 및 금/압타머/트롬빈/그래핀 산화물 전극으로 갈수록 EIS의 전하 이동 저항값 및 CV의 환원 피크 분리가 점점 증가하는 것으로 보아 전극의 제조 단계별 센서 표면이 잘 형성되어 있음을 알 수 있다.

[0051] 1-3. 트롬빈 검출의 민감도(sensitivity) 평가

[0052] 트롬빈 검출에 대한 민감도를 평가하기 위하여, 트롬빈의 농도를 0 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml 100 ng/ml 및 1 ug/ml으로 하여 금/압타머/트롬빈/그래핀 산화물 전극에 대한 환원 전류를 0.0 V 부터 -1.2 V까지 전압을 가하여 측정하였다. 트롬빈 농도에 따른 (a) 순환전압전류법의 측정 결과, 및 (b) 환원 전류 값의 변화를 도 4에 나타내었다.

[0053] 도 4(a)에 나타난 바와 같이, 환원 피크 전류는 -0.9 V에서 나타났으며, 트롬빈의 농도가 증가함에 따라 환원 피크 전류가 증가함을 확인하였다. 따라서 트롬빈의 농도가 증가할수록 전극에 결합하는 그래핀 산화물의 양이 증가한다는 사실을 확인하였다.

[0054] 도 4(b)에 나타난 바와 같이, 선형 상관 계수가 0.987인 교정 곡선(calibration curve)을 얻었으며, 이를 통하여 100 pg/ml의 아주 낮은 검출 한계(detection limit)를 얻었다.

[0055] 1-4. 트롬빈 검출의 선택도(selectivity) 평가

[0056] 트롬빈 검출에 대한 선택도를 평가하기 위하여, 트롬빈, ADH, Avidin, Rabbit-IgG, 및 Myoglobin의 다양한 단백질의 종류에 따른 (a) 순환전압전류법의 측정 결과, 및 (b) 환원 전류 값의 변화를 도 5에 나타내었다.

[0057] 도 5에 나타난 바와 같이, 트롬빈의 경우에는 ADH, Avidin, Rabbit-IgG, 및 Myoglobin에 비하여 환원 피크 전류가 증가한 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 검출용 바이오 센서는 트롬빈에 특이적임을 확인할 수 있다.

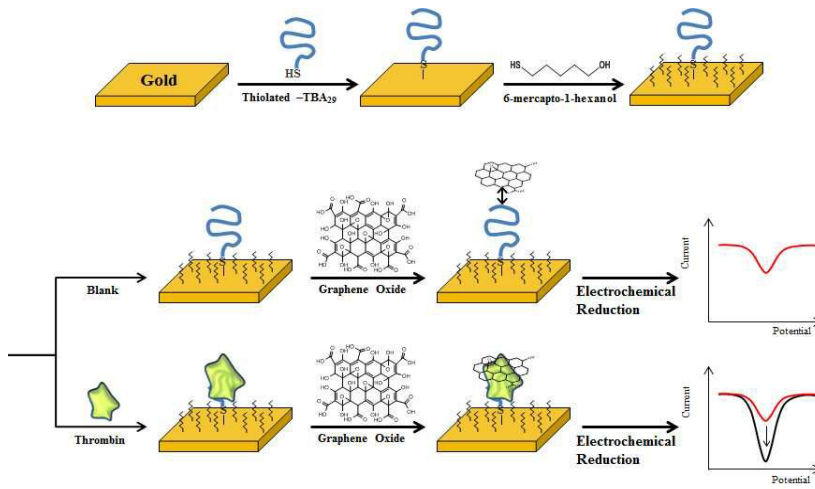
[0058] 실험예 2. 주사 전자 현미경(SEM) 측정

[0059] 전극 표면에 흡착된 그래핀 산화물의 양을 확인하기 위해, 주사 전자 현미경(SEM) 이미지를 측정하였다. 트롬빈 용액에 (a) 담그기 전, 및 (b) 담근 후의 그래핀 산화물 처리된 전극 표면의 SEM 이미지를 도 6에 나타내었다.

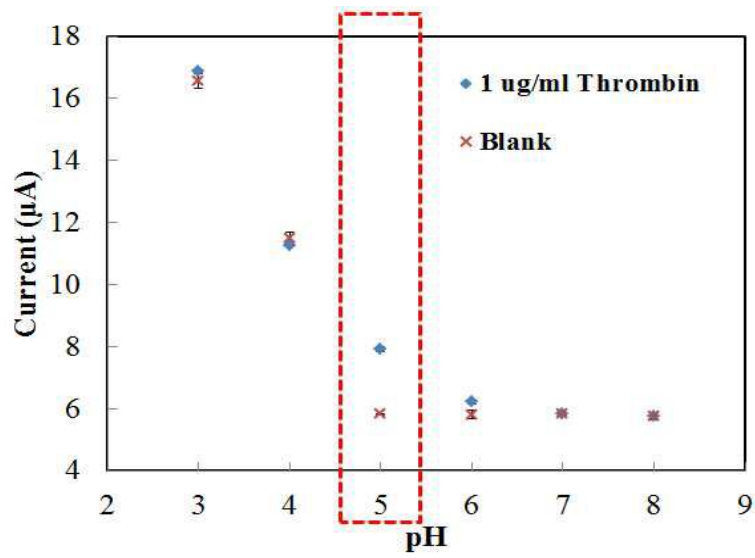
[0060] 도 6에 나타난 바와 같이, 트롬빈 용액에 담근 후에 그래핀 산화물 처리된 전극 표면의 경우, 흡착된 그래핀 산화물의 양이 훨씬 많은 것을 확인할 수 있다.

도면

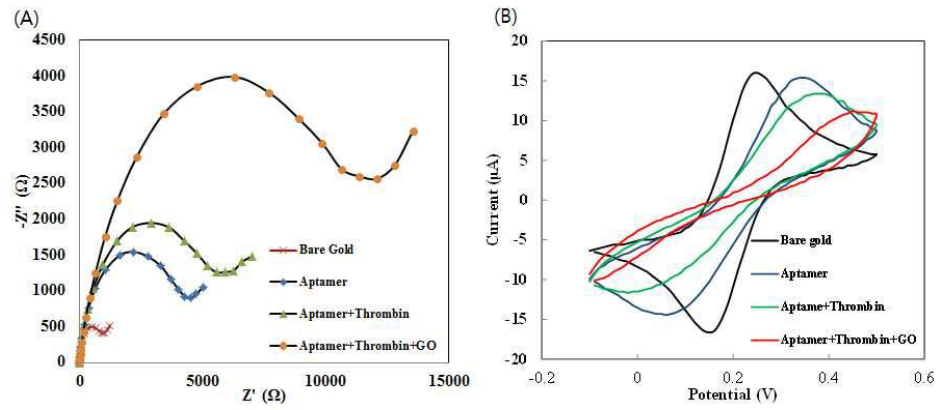
도면1



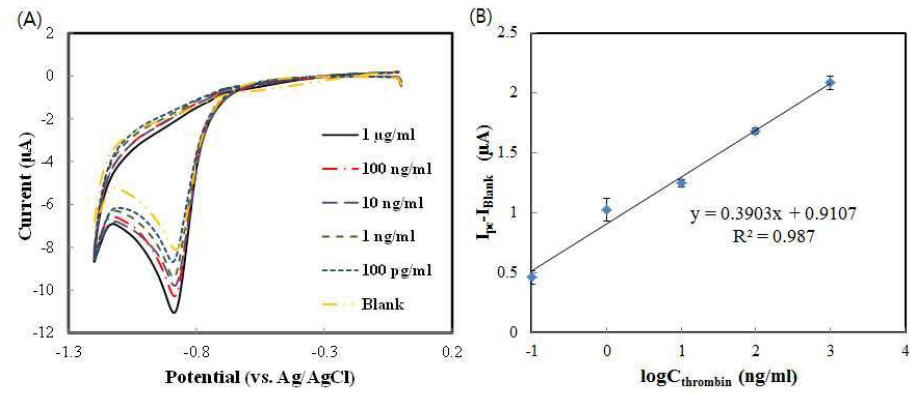
도면2



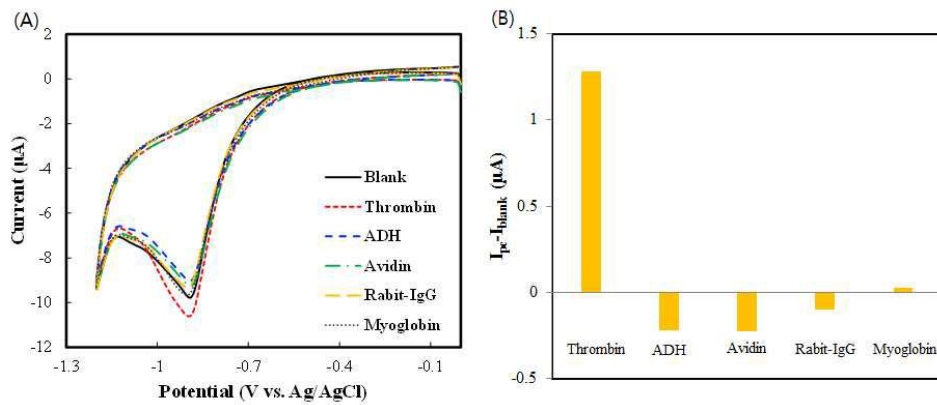
도면3



도면4



도면5



도면6

