



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0101807
(43) 공개일자 2013년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 27/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0022832

(22) 출원일자 2012년03월06일

심사청구일자 2012년03월06일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

최정우

서울특별시 용산구 한강로3가 63-389(2/9) 용산 시티파크 103-603

이자이 야가타

서울특별시 마포구 염리동 81-56

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

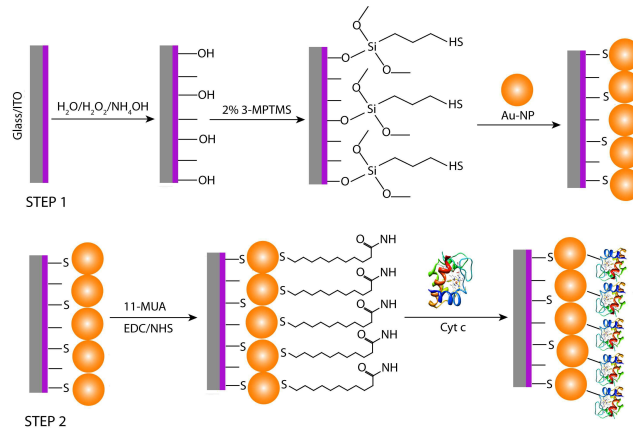
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 과산화수소 검출용 센서

(57) 요약

본 발명은 과산화수소 검출용 센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (a) 전도성 산화물(Conducting Oxide) 기질 상에 결합된 금(Au) 나노입자; 및 (b) 상기 금(Au) 나노입자에 결합된 시토크롬 c를 포함하는 과산화수소 검출용 센서이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 과산화수소 검출용 센서는 고감도 및 고속의 장점을 갖으며, 과산화수소의 농도가 증가할수록 증가하는 전류값을 나타내어 분석이 용이하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이택

서울특별시 동작구 상도1동 래미안상도3차아파트
316동 1403호

민준홍

서울특별시 동작구 흑석로 48 중앙대학교 융합공학
부

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-008206
부처명	교육과학기술부
연구사업명	(대)원천기술개발사업, (중) 미래기반 기술개발사업
연구과제명	생물분자로 구성된 바이오 전자소자개발
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2005.04.15 ~ 2014.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0010249
부처명	교육과학기술부
연구사업명	미래기초과학 핵심리더 양성 사업
연구과제명	제조합 단백질/ 무기질입자 혼성체로 구성된 고체상태의 바이오메모리 개발
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2011.03.01 ~ 2014.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2012-0000163
부처명	교육과학기술부
연구사업명	(중) 중견연구자지원사업 (소) 도약연구지원사업
연구과제명	나노 신경줄기세포 전자칩 기술 개발
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2009.05.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 전도성 산화물(Conducting Oxide) 기질 상에 결합된 금(Au) 나노입자; 및 (b) 상기 금(Au) 나노입자에 결합된 시토크롬 c를 포함하는 과산화수소 검출용 센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 전도성 산화물은 인-주석 산화물, 인-아연 산화물, 주석 산화물, 아연 산화물, 구리-알루미늄 산화물, 구리-갈륨 산화물, 구리-스칸듐 산화물, 구리-크롬 산화물, 구리-인 산화물, 구리-이트륨 산화물 및 은-인 산화물로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전도성 산화물인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 전도성 산화물은 인-주석 산화물인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 금 나노입자는 상기 전도성 산화물의 기질 상에 도입된 설프하이드릴(sulfhydryl)기를 통하여 간접적으로 상기 기질에 결합된 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 시토크롬 c는 상기 금 나노입자의 표면에 도입된 아미노기를 통하여 간접적으로 상기 금 나노입자에 결합된 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 센서는 상대 전극 및 기준 전극을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 센서는 0.5 μ M의 검출한계를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 센서는 10초 내에 안정된 전류에 도달하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 분석 시료 내 과산화수소 검출 방법:

- (a) 상기 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 과산화수소 검출용 센서를 준비하는 단계;
- (b) 상기 센서에 분석 시료를 접촉시키는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)에서 발생하는 전기적 신호를 측정하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 과산화수소 검출용 센서에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 과산화수소(H_2O_2)의 검출은 산업, 임상조절 및 환경 보호 등의 많은 분야에서 중요하게 여겨진다.^{1,2} 과산화수소를 검출하기 위해 많은 분석법이 개발되었지만, 높은 민감도 및 분리감도를 갖고 사용이 용이한 전류측정 효소-기반 바이오센서에 대한 관심이 높다.^{3,4} 그러나, 높은 민감도 및 안정성을 갖는 센서를 개발하기 위해서는 고상 전극 표면에 효소 및/또는 어떠한 나노구조(예컨대, 탄소 나노튜브, 퀀텀 닷 및 나노입자 등)의 물질을 효율적으로 고정화시키는 것이 중요하다.⁵ 과산화수소를 검출하기 위한 전기화학적 바이오센서는 대개 탄소 기반의 전극 물질에 홀스래디쉬 과산화효소(Horseradish peroxidase)를 고정화한다.⁶

[0003] 수많은 전기화학적 기술은 전극과 고정된 HRP 간에 직접적으로 전자전달 되는 비매개(unmediated) HRP-기반 센서를 제조하기 위해 고정된 HRP의 촉매 작용에 의한 과산화수소의 환원을 이용하였다.⁸⁻¹² 이는 헤모글로빈과 같은 헴 군을 포함하는 단백질 및 과산화수소와 유사한 촉매활성을 갖는 미오글로빈이 과산화수소 검출기를 제조하는데 사용되어 왔다.¹³⁻¹⁶

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 산업적으로 이용할 수 있는 고속 및 고감도 과산화수소 검출용 센서를 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 전도성 산화물 기질 상에 금 나노입자 및 시토크롬 c를 포함하는 전극에 과산화수소를 접촉시키는 경우, 과산화수소의 농도가 증가함에 따라, 전류값이 증가함으로써, 과산화수소를 빠르고 용이하게 검출 할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 과산화수소 검출용 센서를 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 과산화수소 검출 방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 전도성 산화물(Conducting Oxide) 기질 상에 결합된 금(Au) 나노입자; 및 (b) 상기 금(Au) 나노입자에 결합된 시토크롬 c를 포함하는 과산화수소 검출용 센서를 제공한다.

- [0010] 본 발명자들은 산업적으로 이용할 수 있는 고속 및 고감도 과산화수소 검출용 센서를 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 전도성 산화물 기질 상에 금 나노입자 및 시토크롬 c를 포함하는 전극에 과산화수소를 접촉시키는 경우, 과산화수소의 농도가 증가함에 따라, 전류값이 증가함으로써, 과산화수소를 빠르고 용이하게 검출 할 수 있음을 규명하였다.
- [0011] 본 발명의 주요한 특징 중 하나는 유리 기판에 전도성 산화물을 증착한 전도성 산화물 전극을 제조하는 것이다. 상기 전극은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 상기 기판의 표면위에 형성시킬 수 있으며, 바람직하게는 전자빔 증착, 진공 증착, 열증착(thermal evaporation), 스핀코팅(spin coating), 진공 증착, 스퍼터링(sputtering), 저압 화학기상법, 졸-겔 합성법, 전기 도금 또는 무전해 도금법이다.
- [0012] 본 명세서에서 용어 ‘전도성 산화물(Transparent conductive oxide; TCO)’은 전도성 필름의 하나로 광학적으로 투명하고 전기적 전도성을 갖는다. 광전지에 사용되는 전도성 필름은 무기물 및 유기물로 제조된다. 전형적으로 무기 필름은 인-주석 산화물, 플루오린 도프 주석 산화물 및 도프 아연 산화물과 같은 일반적인 전도성 산화물 층으로 구성된다. 유기 필름은 적외선에 높은 투명도를 갖게 제조할 수 있는 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜 및 그의 유도체와 같은 폴리머 망과 함께 탄소 나노튜브 망 및 그래핀을 사용하여 개발되었다. 투명 전도성 필름은 대부분 다결정 또는 무형 미세구조로 제조된다. 평균적으로, 이러한 적용은 효율적인 담체 전송을 위해 입사광선의 80% 투과도보다 우수하고 10^3 S/cm보다 높은 전도성의 전극 물질을 사용한다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 전도성 산화물은 인-주석 산화물, 인-아연 산화물, 주석 산화물, 아연 산화물, 구리-알루미늄 산화물, 구리-갈륨 산화물, 구리-스칸듐 산화물, 구리-크롬 산화물, 구리-인 산화물, 구리-이트륨 산화물 및 은-인 산화물로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전도성 산화물이고, 보다 바람직하게는, 인-주석 산화물이다.
- [0014] 본 발명의 인-주석 산화물(Indium tin oxide; ITO, 또는 주석-도프 인 산화물)은 인(III) 산화물(In_2O_3) 및 주석(IV) 산화물(SnO_2)의 고용체로 일반적으로 중량부 90% In_2O_3 및 10% SnO_2 로 구성된다. In^{3+} 이온 자리를 Sn^{4+} 이온이 치환하면서 전자를 내어 놓아 전자 농도가 높아지게 되어 낮은 비저항을 나타내게 된다. 이러한 치환 과정은 높은 에너지를 필요로 하기 때문에 당업계의 통상적인 일반기술에 따르면, 유리 기판 상에 증착할 경우 300도 이상의 온도로 기판 온도를 상승시켜 주석 이온이 쉽게 인 이온 자리를 치환 할 수 있어 낮은 저항의 인-주석 산화물 전극을 제작한다. ITO는 투명한 무색의 박막으로 대량으로 있을 시, 노르스름한 회색을 띤다. 적외선 영역에서, 금속-유사 거울로 작용한다.
- [0015] 인-주석 산화물은 전기적 전도성 및 광학적 투명성 때문에 가장 널리 쓰이는 투명한 전도성 산화물 중 하나이다. 뿐만 아니라, 박막으로 용착하기 용이하다. 모든 투명 전도성 필름과 마찬가지로, 두께의 증가 및 전하 담체의 농도 증가는 투명성은 감소시키면서 물질의 전도성을 증가시키기 때문에 전도성 및 투명성을 절충해야 한다.
- [0016] 인-주석 산화물의 필름은 전자선 증착(electron beam evaporation), 물리 증착법(physical vapor deposition) 또는 스퍼터 디포지션(sputter deposition techniques) 방법에 의해 표면에 용착하는데 널리 쓰인다.
- [0017] 본 발명의 주요한 특징 중 다른 하나는 전도성 산화물 기질 상에 금 나노입자를 고정화 하는 것이다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 금 나노입자는 상기 전도성 산화물 기질 상에 도입된 설프하이드릴(sulfhydryl) 기를 통하여 간접적으로 상기 기질에 결합한다.
- [0019] 바람직한 구현예에 따르면, 유리 기판 상의 전도성 산화물 기질을 2%(v/v) 3-MPTMS(3-Mercaptopropyl trimethoxysilane)을 포함하는 메탄올에서 밤새 반응하여 ITO 표면에 -SH 기를 생성하였다. 세척한 후, 금속-티올 작용을 통해 ITO/AuNPs 기질이 생성되도록 ITO/MPTMS 기질을 금 콜로이드 용액에 2시간 동안 침지하여, 투명전도성 산화물/금 나노입자 혼성체를 제조하였다.
- [0020] 본 발명의 주요한 특징 중 또 다른 하나는 전도성 산화물/금 나노입자 혼성체 상에 시토크롬 c를 고정화 하는 것이다.
- [0021] 바람직한 구현예에 따르면, 투명전도성 산화물/금 나노입자 전극을 30 mM 11-MUA(11-mercaptoundecanoic acid)와 반응시키고 EDC(N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide) 및 NHS(N-hydroxysuccinimide)로

활성화하였다. 20 μl 시토크롬 c를 활성화된 전극 표면에 첨가하고 전도성 산화물/금 나노입자/시토크롬 c 전극을 탈염수로 세척하여 결합되지 않은 시토크롬 c 분자를 제거하고 질소증기 하에 건조하여 투명전도성 산화물/금 나노입자/시토크롬 c 전극을 제조하였다.

[0022] 본 발명에 따르면, 시토크롬 c는 H_2O_2 의 촉매에 대한 퍼옥시다아제의 유사성으로 인해 고유한 퍼옥시다아제 활성을 갖고 산소-특이적 단백질이 아니기 때문에, 인가된 전위 하에 산소의 존재에 의해 간섭받지 않는다. 또한, 시토크롬 c의 헴 보결분자측(heme prosthetic group)이 단백질에 공유결합 되어 있어 유기용제 하에 반응 시 헴 보결분자측이 결실되지 않는다. 시토크롬 c는 pH 2 내지 pH 11의 넓은 pH 범위에서 활성을 갖으며, 열안정성이 높아 고온 및 화학적 모디피케이션 후에도 생체촉매반응을 수행할 수 있다. 또한, 시토크롬 c는 저가이므로, 대규모 생체 촉매에 경제적이다.

[0023] 바람직하게는, 상기 시토크롬 c는 상기 금 나노입자의 표면에 도입된 아미노기를 통하여 간접적으로 상기 금 나노입자에 결합된다.

[0024] 본 발명의 과산화수소 검출용 센서를 전기화학적으로 구현하는 구체적인 실시예를 참조하여 설명하면 다음과 같다:

[0025] 본 발명은 전기화학적 방법으로 과산화수소의 농도에 따라 고정된 단백질의 산화와 환원 상태를 변화하여 과산화수소 검출이 가능한 센서에 관한 것이다. 단백질 박막이 형성된 기관은 전해질 용액, 예컨대 HEPES 전해질 안에 배치된다. 기관은 작업 전극으로 포텐티오스택에 연결되어 작동하고 전해질 안에 기준 전극(예컨대, Ag/AgCl)과 상대 전극(예컨대, Pt)가 삽입된다. 기준 전극은 포텐티오스택이 전압을 스위칭하는 경우 작업 전극의 전위 변화를 읽어내는 기준이 된다. 상대 전극은 포텐티오스택의 전위 조절에 의해 전자가 흐르게 되는 통로다. 이와 같은 3 전극 시스템은 전기화학에서 가장 많이 구성하는 시스템 중의 하나인 것으로 알려져 있다. 상기 간단한 전기화학 시스템에서 순환전류전압법을 통해 간단한 전압-전류 곡선을 얻는다. 또한 구성된 전기화학 시스템의 평형 전위를 알기 위해 개회로 전위를 측정한다. 개회로 전위란 아무런 전압을 가하지 않은, 일종의 회로가 끊어져 있는 상태에서 단백질 박막의 고유 특성과 전해질의 고유 특성에 의해 일정 전위 차가 형성되게 되고 구성된 시스템이 자연적으로 평형에 이르는 특정 전위를 가지게 된다는 것을 의미한다. 상기 원리를 역으로 이용하면 한 시스템의 개회로 전위를 알고 있을 때 개회로 전위를 시스템에 인가하면 시스템을 인위적으로 평형 상태에 근접하게 만들 수 있게 된다. 이를 구체적으로 설명하면 단백질 박막에 특정 환원 전위가 인가되어 단백질이 전해질로부터 전자를 받아 환원 되었을 경우, 여기에 개회로 전위를 인가하면 단백질 박막이 본래의 자연적 평형 상태로 돌아가면서 흘러 들어갔던 여분의 전자를 내보내게 된다는 것을 의미한다. 반대로 단백질 박막이 전자를 내보내며 산화되었던 경우에 있어서도 개회로 전위가 인가되면 흘러나왔던 전자들이 다시 흘러 들어가면서 본래의 전위 상태로 돌아가게 된다. 즉 개회로 전위는 단백질 박막의 산화환원 상태를 읽어내는 역할을 하게 되는 것이다.

[0026] 바람직하게는, 상기 센서는 상대 전극 및 기준 전극을 추가적으로 포함한다.

[0027] 본 발명의 과산화수소 검출용 센서는 적은 양의 과산화수소도 검출 할수 있으며, 바람직하게는 0.5 μM 의 검출 한계를 갖는다. 또한, 10초 내에 안정된 전류에 도달하여 고속으로 결과를 알 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 분석 시료 내 과산화수소 검출 방법을 제공한다:

[0029] (a) 상기 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 과산화수소 검출용 센서를 준비하는 단계;

[0030] (b) 상기 센서에 분석 시료를 접촉시키는 단계; 및

[0031] (c) 상기 단계 (b)에서 발생하는 전기적 신호를 측정하는 단계.

[0032] 본 명세서에서, 상기 ‘분석 시료’는 과산화수소를 포함할 수 있는 조직 세포, 체액, 혈액 및 혈장과 같은 생물학적 시료 및 환경학적 시료를 말하며, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 본 발명의 투명전도성 산화물/금 나노입자/시토크롬 c 전극에 의한 과산화수소의 검출은 다음의 반응식을 통해 이뤄진다:

[0034] [반응식]



[0035]

[0036] 시토크롬-Fe(III)에서 전자가 방출되어 시토크롬-Fe(II)가 생성되고 상기 시토크롬-Fe(II) 2분자와 2H^+ 및 H_2O_2 가 반응하여 2분자의 시토크롬-Fe(III)와 2분자의 물이 생성되는 반응을 통해 과산화수소가 환원되는 과정을 통해, 전류값이 상승되어 과산화수소를 검출하게 된다.

[0037] 본 발명의 방법은 상기 과산화수소 검출용 센서를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0039] (a) 본 발명은 고속 및 고감도 과산화수소 검출용 센서를 제공할 수 있다.

[0040] (b) 본 발명의 과산화수소 검출용 센서를 구성하는 시토크롬 c는 기존의 과산화수소 검출용으로 이용되는 헤모글로빈 및 미오글로빈과 다르게 산소에 의해 간섭 받지 않으며, pH 2 내지 pH 11의 넓은 pH 범위에서 활성을 갖고, 열안정성이 높아 고온 및 화학적 модификация 후에도 생체측매반응을 수행할 수 있다.

[0041] (c) 본 발명의 과산화 검출용 센서는 과산화수소의 농도가 증가할수록 증가하는 전류값을 나타내어 분석이 용이하다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 ITO/AuNPs 전극에 cyt c를 고정하기 위한 전극 модификация 과정의 도식화를 보여준다.

도 2는 SEM 이미지를 보여준다. 도 2(a) 내지 도 2(c)는 ITO 표면, ITO 표면 상의 금 나노입자 및 ITO/AuNP 전극 표면에 고정된 시토크롬이며, 스케일 바는 500 nm를 나타낸다. 도 2(d)는 ITO 표면의 지형학 이미지이고 스케일 바는 250 nm이며, 도 2(g)는 도 2(d)의 조도 분석 그래프이다. 도 2(e)는 ITO/MPTMS 표면에 흡착된 AuNPs의 지형학 이미지이고, 도 2(h)는 도 2(e)의 거칠기 분석 그래프이다. 도 2(f)는 ITO/AuNP 표면에 흡착된 cyt c의 지형학 이미지이고 도 2(i)는 도 2(f)의 거칠기 분석 그래프이다. 이미지는 1 Hz로 스캔하였다. 거칠기 분석 그래프의 R_a 는 거칠기 중간값, R_q 는 평균제곱근(Root Mean Square; RMS), R_{max} 는 최대 높이, R_z 는 10 pt. 거칠기 중간값, R_p 는 거칠기 피크 한계점 최대 피크 높이, R_{pm} 은 거칠기 평균 최대 높이 및 R_{vm} 은 최대 깊이를 나타낸다.

도 3은 (a) AuNP/ITO; (b) cyt c/ITO/ 및 (c) cyt c/AuNP/ITO 표면의 X-선 회절 패턴을 각각 보여준다.

도 4(a)는 HEPES 버퍼 용액(pH 7)에서 0.05 Vs^{-1} 스캔율로 (i) ITO, (ii) ITO/AuNP, (iii) ITO/AuNP/cyt c 전극에 대한 순환 볼타모그램을 나타낸다. 도 4(b)는 10 mM, pH 7.0의 HEPES 버퍼에서 스캔율을 0.01 Vs^{-1} 에서 0.1 Vs^{-1} 로 증가할 때의 ITO/AuNP/cyt c 전극의 순환 볼타모그램을 나타낸다.

도 5(a)는 음성(ipc) 및 양성(ipa) 피크 전류 대(vs.) 스캔율의 플롯을 보여준다. 도 5(b)는 음성(ipc) 및 양성(ipa) 피크 전류 대(vs.) $\log(\text{스캔율})^{1/2}$ 의 플롯을 보여준다. 도 5(c)는 피크 전위(E_{pa} 및 E_{pc})의 변수 대(vs.) 10 mM, pH 7.0의 HEPES 버퍼에서 ITO/AuNP/cyt c 전극의 스캔율의 로그에 대한 플롯을 보여준다. 직선은 곡선의 선형 피트를 나타낸다.

도 6은 10 mM, pH 7.0의 HEPES 버퍼 5 ml에 100 mM H_2O_2 5 μl 를 첨가하였을 때, H_2O_2 에 대한 ITO/AuNP/cyt c 전극의 시차펄스전압전류법을 나타낸다.

도 7(a)는 질소 대기 하에 -0.1 V 전위를 인가하고 10 mM HEPES 버퍼(pH 7)에 200 mM H_2O_2 20 μ l를 연속적으로 첨가하여 ITO/AuNP/cyt c 전극에 대한 전류-시간 곡선을 보여준다. 질소 대기 하에 -0.1 V의 전위에서 10 mM HEPES 버퍼 용액 5 ml에 200 mM H_2O_2 20 μ l를 첨가하여 분석한 도 7(b)는 cyt c/ITO에 대한 대시간전압전류 곡선이고, 도 7(c)는 AuNP/ITO에 대한 대시간전압전류 곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0044] 실시예

[0045] 실험 재료 및 방법

[0046] 화학 시약

[0047] 말 심장의 시토크롬(cytochrome) c를 시그마-알드리치사(cyt c, 순도 99.7%, 산소 함량 7.0%)로부터 구매하여 추가 정제 없이 사용하였다. 3-아미노프로필 트리에톡시실란(3-Aminopropyl trimethoxysilane, 3-APTES; 순도 99%), 3-머캅토프로필 트리메톡시실란(3-Mercaptopropyl trimethoxysilane, 3-MPTMS; 순도 85%) 및 금 콜로이드 용액(-0.01% HAuCl₄)을 시그마-알드리치사로부터 구매하여 추가 정제 없이 사용하였다. N-히드록시석시니미드(N-hydroxysuccinimide; NHS), 1-에틸-3-(3-디에틸아미노프로필) 카르보다이미드 히드록클로라이드(1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride; EDC)는 시그마 사로부터 구매하였다. 30% 과산화수소는 대정화금(대한민국)으로부터 구매하고 탈염수에 희석하여 물 수용액을 준비하였다. 10 mM HEPES 버퍼 수용액(pH 7.0)은 모든 전기화학적 실험에 사용하였다. 모든 수용액은 밀리-Q 시스템(Millipore, 미국)을 사용하여 정제한 물(18 M Ω cm)로 제조하였다.

[0048] 전극 모디피케이션

[0049] 40 nm의 두께를 갖는 인-주석 산화물(Indium tin oxide; ITO; 20 Ω /cm²)을 실험에 사용하였다. 투명 전극을 트리톤 X-100/물(1:5, v/v), 물 및 에탄올에서 각 최소 40분 동안 초음파 세척하였다. ITO 전극을 NH₄OH:H₂O₂:H₂O(1:1:5) 수용액에서 40분 동안 80°C 로 가열하고 물로 세척하여 질소증기 하에 건조시킴으로써 표면에 $-OH$ 기를 생성하였다.

[0050] 나노입자 및 시토크롬 c의 혼성체의 제조

[0051] AuNP-cyt c 혼성체를 제조하기 위해, $-OH$ 말단을 갖는 ITO 기질을 2% (v/v) 3-MPTMS를 포함하는 메탄올에서 밤새 반응하여 ITO 표면에 $-SH$ 기를 생성하였다. 세척한 후, 금속-티올 작용을 통해 ITO/AuNPs 기질이 생성되도록 ITO/MPTMS 기질을 금 콜로이드 용액에 2시간 동안 침지하였다. ITO/AuNPs/cyt c 기질을 제조하기 위해, ITO/AuNPs를 30 mM 11-MUA(11-mercaptopundecanoic acid)와 반응시키고 EDC(N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide) 및 NHS(N-hydroxysuccinimide)로 활성화하였다. 20 μ l cyt c를 활성화된 전극 표면에 첨가하였다. ITO/AuNP/cyt c를 탈염수로 세척하여 결합되지 않은 단백질 분자를 제거하고 질소증기 하에 건조하였다.

[0052] cyt c/ITO 전극을 제조하기 위해, ITO 전극을 2% APTES 용액에 포함된 에탄올에서 6시간 동안 반응하였다. 샘플을 에탄올 및 탈염수로 세척하였다. 다음, 기질을 1% 글루타르산 무수물(Glutaric unhydride; GA)에 실온에서 밤새 침지하였다. 기능화된 기질을 탈염수로 세척하고 질소증기 하에 건조하였다. 20 μ l cyt c를 기질에 3시간 동안 반응하고 탈염수로 세척 후 질소증기 하에 건조하였다. ITO/AuNPs 전극에 cyt c를 고정하기 위한 전극 모디피케이션 과정을 도 1에 도식으로 나타내었다.

- [0053] ITO/AuNP/cyt c 표면의 특성
- [0054] 원자력현미경(Atomic Force Microscopy; AFM, 나노스코프 IV/멀티모드, 미국)를 이용하여 ITO, ITO/AuNP 및 ITO/AuNP/cyt c 전극 표면의 표면 지형학을 조사하였다. 모든 결과는 250 내지 300 kHz의 공명진동수(resonance frequency, f_0)를 갖는 실리콘 캔틸레버(cantilevers)를 사용하여 탭핑 모드로 기록하였다. 모든 결과는 22℃에서 측정하였다. 이미지의 조도(roughness) 및 섹션 분석은 나노스코프의 오프라인 과정을 통해 실시하였다. SEM 측정은 JEOL JSM S-4300을 사용하여 20 kV의 전압에서 실시하였다.
- [0055] 조도 파라미터는 3 전극 표면 특성의 다목적 특징을 위해 고안하였다. 평균제곱근(Root Mean Square; RMS) 조도 R_q 는 가장 흔하게 쓰이는 조도 파라미터로, 높이의 표준편차를 제공한다. 진폭 파라미터 R_z 는 결과에 대한 극한 높이차를 제공한다. 표면 비대칭도 R_{sk} 는 높이 분포의 비대칭도를 나타낸다. 0의 비대칭도 값은 가우스(Gaussian)-유사 표면을 나타낸다. R_{sk} 의 음의 값은 피크(peak)보다 밸리(valley)가 우세한 다공성 표면 샘플을 말하며, R_{sk} 의 양의 값은 부분적 서밋(summit)이 밸리보다 우세함을 말한다.
- [0056] 제조한 샘플의 X-선 회절 패턴은 2θ 에서 초당 0.02° 의 스캔을 조건의 리가쿠(Rigaku) X-선 회절계에서 Cu K α 방사선(λ) 1.54056 Å을 나타내었다. X-선 회절계는 40 kV 및 150 mA로 작동하였다.
- [0057] 과산화수소의 전기화학적 활성 및 검출
- [0058] 작동전극으로 ITO/AuNP/cyt c 기질, 상대전극으로 백금 코일, 기준전극으로 Ag/AgCl/KCl_{sat}를 이용하여 순환 전압전류법(Cyclic Voltammetry; CV)를 수행하였다. CHI660A 일정전위기를 이용하여 50 mV s^{-1} 의 스캔율에서 0.2 내지 -0.4 V의 전위 범위로 실험을 수행하였다. 변형된 ITO 전극과 다양한 과산화수소 농도에서 ITO/AuNP/cyt c를 이용하여 시차펄스전압전류법(Differential Pulse Voltammetry; DPV) 및 대시간전류법(chronoamperometry)을 수행하였다. 5mL의 10 mM HEPES(pH 7.0)에 200 mM 과산화수소를 20 μL 씩 연속 첨가하고 전위를 -0.10 V로 설정하여 전류-시간 곡선을 기록하였다.
- [0059] 결과 및 토론
- [0060] SEM 및 TEM을 사용한 지형학 분석
- [0061] ITO, ITO/AuNP 및 ITO/AuNP/cyt c의 지형학적 특징을 SEM을 이용하여 측정하였다(도 2의 (a) 내지 (c)). AuNP는 ITO 표면에 잘 부착되었고 -40 nm의 입자 직경을 갖는 것을 확인하였다. 또한, cyt c 고정화 후 입자의 이미지를 나타내는 도 2(c)의 입자는 최대 -50 nm의 직경을 갖는 것으로, cyt c가 ITO 표면 상의 AuNP에 부착함을 확인하였다. 도 2의 (d) 내지 (f)는 3 가지(ITO, ITO/AuNP 및 ITO/AuNP/cyt c) 다른 샘플 표면을 1 Hz로 스캔한 전형적인 AFM 결과를 보여준다. MPTMS/ITO 상에 고정된 AuNPs의 크기는 AuNPs 콜로이드의 크기보다 2-3배 컸다. 이는 AuNPs의 응집 및 AFM 팁의 컨볼루션(convolution) 때문일 것이다. 그러나, 결과는 cyt c가 ITO 기질 상의 AuNPs에 연결된 것을 명백히 보여준다. 스캔 결과로부터 얻은 조도 파라미터 그래프를 도 2의 (g) 내지 (i)에 나타내었다. 3 표면의 선별된 조도 파라미터를 표 1에 나타내었다.

표 1

	ITO surface	ITO/AuNP	ITO/AuNP/cyt c
Roughness average (R_a)(nm)	4.20 ± 0.365	3.35 ± 0.75	3.19 ± 1.09
RMS roughness (R_z)(nm)	5.08 ± 0.386	4.40 ± 0.8	4.01 ± 1.04
Peak to peak height (R_p)(nm)	32.3 ± 3.31	45.1 ± 3.2	147 ± 11.73
Slewness(R_{sk})	-0.36 ± 0.11	0.56 ± 0.3	0.25 ± 0.16
Kurtosis(R_{kz})	2.60 ± 0.314	3.13 ± 0.41	3.73 ± 0.433
Max. peak height(R_p)(nm)	12.9 ± 0.87	16.8 ± 4.08	18.8 ± 2.01
Particle height (section analysis)(nm)	3.48 ± 0.74	4.05 ± 0.57	15.0 ± 1.89

- [0062]
- [0063] 나노스코프를 이용한 오프라인 섹션 분석은 AuNP 및 cyt c의 높이가 각각 4 nm 및 15 nm임을 보여주었다. AuNP 입자의 직경은 40 nm로 관찰되었고 이는 이러한 구조는 -2개의 입자 응집체를 말한다. 또한, 단일 cyt c

분자의 크기는 3 nm이다.¹⁸ 이는 응집된 AuNPs가 ITO 기질에 부착한 것을 의미하며 결과적으로 -50 nm의 AuNP-cyt c 혼성체가 형성됨을 말한다. 표 1은 각 샘플에 대한 RMS 조도가 감소하고 ITO 표면에 대한 높이를 보여준다. ITO 표면은 거칠고 직경 10 내지 50 nm의 수많은 알갱이로 구성되어 있다. 비대칭도(R_{sk}) 값은 피크가 밸리보다 우세함을 나타낸다. 이러한 결과를 조합하여 입자(AuNPs 및 cyt c)가 표면에 잘 고정되어있는 것을 확인하였다. 또한 밸리보다 우세한 높은 부분의 첨예도(R_{ku})는 증가하였다. 최대 피크 높이(R_p)는 3 샘플에서 증가하였다. 이러한 결과를 근거로, cyt c가 AuNPs에 잘 부착되어 ITO 표면 상에 혼성체(ITO/AuNP/cyt c)를 형성함을 확인하였다.

[0064] ITO 전극 상에 혼성체 형성을 확인한 X-선 회절 분석

[0065] AuNPs, cyt c 및 AuNPs와 결합한 cyt c의 X-선 회절 패턴을 구하였다(도 3). XRD(X-Ray Diffraction) 측정을 사용하여 AuNPs에 cyt c가 잘 결합함을 확인하였다. 도 3에서 볼 수 있듯이, AuNPs 스펙트럼(a)에 대한 패턴을 구하고 JCPDS(Joint Committee on Powder Diffraction Standards) 카드 파일 번호 01-073-1234에 기초하여 구조를 확인하였다. 이러한 패턴으로 입자의 결정도를 확인하였다. 스펙트럼(b)에서 관찰된 넓은 피크 어라운드 $2\theta=18^\circ$ 는 cyt c의 헴(Heme) 중심이다. XRD 스펙트럼(c)에서 회절 피크는 cyt c의 넓은 피크와 함께 양나노입자에 대해 보일 수 있다. AuNPs-cyt c 결합체의 스펙트럼은 이러한 피크의 조합으로 보여지며, 조립 과정 결과 전극 표면에 혼성체의 형성됨을 증명한다.

[0066] ITO/AuNP/cyt c 전극의 순환 전압전류법

[0067] ITO/AuNP/cyt c 전극의 산화환원 반응의 특성을 조사하기 위해 10 mM pH 7.0 HEPES 버퍼에서 50 mVs^{-1} 스캔율로 순환 전압전류법 연구를 수행하였다. 도 4(a)에서 확인 할 수 있듯이, 0.4 내지 -0.2 V의 전위범위에서 ITO(곡선 i) 및 ITO/AuNP(곡선 ii) 전극에 대한 분명한 산화환원반응의 피크는 관찰되지 않았다. 그러나 대조군 ITO 전극과 비교하여 ITO/AuNP 전극에 대한 약간의 증가가 관찰되었다. 또한, ITO/AuNP/cyt c 전극은 전자교환을 담당하는 $\text{Fe}^{3+/2+}$ 산화환원 중심에 의한 한 쌍의 명확한 준-가역 산화환원 피크(곡선 iii)를 보여주었다. 양성 피크 전위(E_{pa}) 및 음성 피크 전위(E_{pc})는 각각 0.09 및 0.02 V(vs. Ag/AgCl)이고, 피크-to-피크 분리(ΔE_p)는 70 mV이다. 또한, 나노입자는 산화환원 반응 중심 및 전극 표면 사이의 총 거리의 증가에도 불구하고, 계면의 전기화학적 전자전송율을 상당히 향상시켰다.

[0068] 10 mM HEPES에서 0.01 내지 0.1 Vs⁻¹의 각각 다른 스캔율 조건으로, ITO/AuNP/cyt c 전극의 순환 볼타모그램을 수집하여 도 4(b)에 나타내었다. 환원 및 산화 피크는 약간의 이동과 함께 음성 및 양성 피크 전위에서 각각 다른 스캔율에 대하여 증가하였다.

[0069] 더욱이, ITO/AuNP/cyt c 전극에 대한 조사는 도 5(a)에서와 같이 스캔율 및 스캔율의 로그에 대하여 각각 양성 및 음성 피크 전류에 대한 선형 플롯을 나타내었다. 이러한 분석에 기초하여, 스캔율의 증가는 산화 웨이브가 양성 전위로 더 변화하고 환원 웨이브를 음성 전위로 더 변화하게 하였다. 양성 및 음성 피크 전위는 $\log v$ 에 의존적이다. $E_p=f(\log v)$ 의 그래프는 음성 피크에 대하여 $-2.3 \text{ RT}/\alpha nF$ 와 동일한 경사를 갖고 양성 피크에 대하여 $2.3 \text{ RT}/(1-\alpha)nF$ 인 두 직선을 나타낸다(도 5c). 전하이동 계수(α)값은 다음의 공식에 기초하여 곡선의 경사로부터 0.456을 나타내었다:

[0070] 상기 k_a (0.037)는 $E_{pa}=f(\log v)$ 로부터 유도한 선의 경사이다; k_c (0.044)는 $E_{pc}=f(\log v)$ 로부터 유도한 선의 경사이다; α 는 전하-이동 계수이다. 전극 및 층에 증착된 표면 간의 전자 이동에 대한 분명한 전하-이동을 상수는 다음의 공식에 따라 0.69 s^{-1} 가 된다:

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \left(\frac{RT}{nFv} \right) - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2.3 \text{ RT}}$$

[0071]

[0072] 또한, ITO/AuNP/cyt c 전극에 cyt c의 표면 농도(Γ)는 다음의 공식을 이용한 I_p vs. v 의 경사에 기초하여 추정할 수 있다:

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma v}{4 RT}$$

[0073]

[0074] 상기 I_p 는 환원 피크 전류, v 는 스캔율 및 A 는 전극 표면 영역이다. F 는 패러데이(Faraday)상수이고 R 은 기체 상수, T 는 절대온도이다. Γ 의 값은 $4.2 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^{-2}$ 이다.

[0075] H_2O_2 의 전기촉매 환원

[0076] 시차펄스전압전류법(differential pulse voltammetry technique)은 어떠한 전기화학적 센서의 최고 민감도 및 최저 검출 한계를 결정할 수 있다. 그러므로, ITO/AuNP/cyt c 전극의 전기화학 반응을 H_2O_2 농도에 따라 관찰하였다. 도 6은 10 mM HEPES(pH 7.0)의 버퍼 수용액에서의 시차펄스볼타도그램을 보여준다. 이는 -0.1 V에서 H_2O_2 촉매 환원 전류에 대한 높은 시차 펄스 피크를 분명히 나타낸다. 0.02 V에서 환원을 시작하여도 -0.1 V에서 cyt c가 완전환원 되므로 전위는 -0.1 V로 하였다. H_2O_2 농도가 0.1 mM에서 0.4 mM로 증가 시, 전류 반응도 증가하였다. 전류의 정도 또한 H_2O_2 농도에 따라 증가하였다. 그러므로, 시차펄스법을 사용한 이러한 결과는 변경된 전극이 H_2O_2 의 검출에 사용될 수 있음을 설명한다.

[0077] H_2O_2 의 전류측정 결정

[0078] Cyt c는 H_2O_2 의 촉매에 대한 퍼옥시다아제의 유사성으로 인해 고유한 퍼옥시다아제 활성을 갖는다.⁴² ITO/AuNP/cyt c의 H_2O_2 에 대한 전기촉매 반응을 조사하고 다음의 공식으로 H_2O_2 를 촉매하는 원칙을 설명하였다:



[0079]

[0080] H_2O_2 검출을 위한 혼성체 분자의 촉매 반응을 측정하기 위해 ITO/AuNP/cyt c 전극에 대한 대시간전류법 실험을 실시하였다. 도 7(a)는 pH 7의 10 mM HEPES 5 mL에 200 mM H_2O_2 의 20 μ L를 첨가하여 ITO/AuNP/cyt c에 대한 전형적인 전류-시간 플롯을 설명한다. 버퍼 수용액에 H_2O_2 의 첨가를 추가하였다. 작동 전극 전위는 -0.1 V로 설정하였다. 환원 전류는 가파르게 증가하여 안정값에 도달하였고 이러한 반응은 장시간 매 첨가에서 관찰되었다. 도 7(b)에서 볼 수 있듯이, pH 7의 10 mM HEPES 5 mL에 200 mM H_2O_2 의 20 μ L를 첨가한 후에 cyt c/ITO 전극에 대한 대시간전류법 곡선을 구하였다. 그러나, H_2O_2 의 첨가는 전류를 약간 증가시켰고 AuNP/cyt c 전극과 비교하여 반응이 불안정하였다. 또한, 상기 시스템을 사용하였을 때, 포화 상태에 빨리 도달하였다.

[0081] 도 7(c)는 cyt c가 없는 ITO/AuNP에 대한 전류측정 곡선을 보여준다. 이러한 시스템을 사용할 경우, H_2O_2 의 첨가는 전류에 약간의 증가를 나타내었으나, 반응은 빠르게 포화하였다. 종합적으로, 개발된 전극 센서는 H_2O_2 농도 최대 6 mM까지 선형 반응을 보여주었다. 전류 반응 vs. H_2O_2 의 농도는 환원 전류에서 선형 증가를 보여준다. 현 전극 센서의 검출 한계는 0.5 μ M으로 다른 센서의 검출 한계에 필적한다. 또한, AuNP의 결합으로 인해, 전극은 빠른 전자 전달율을 보여준다. 표 2는 현 전극의 검출 한계를 요약하여 본 발명과 비교하였다. 본 시스템은 H_2O_2 의 첨가 후에 10초 내에 정상 상태 전류의 95%에 도달하였다. 그러므로, 본 발명은 H_2O_2 의 검출에 대해 빠른 반응을 보이는 전극을 개발하였다.

표 2

S. no.	Immobilization matrix	Sensing element	Detection limit (μ M)	Reusability	Refs.
1	Cyt c/poly(ANEA)/GCE	H ₂ O ₂	5.0	-	Ref. [43]
2	Cyt c/MWNT-g-PAN/ITO	H ₂ O ₂	0.3	-	Ref. [47]
3	Cyt c/NPCE	H ₂ O ₂	0.146	1 month	Ref. [48]
4	Cyt c/NP/IL/CNT	H ₂ O ₂	3.0	2 weeks	Ref. [49]
5	Cyt c/Nanoporous Au	H ₂ O ₂	6.3	1 month	Ref. [50]
6	Cyt c/AuNP/ITO	H ₂ O ₂	0.5	2 weeks	Present work

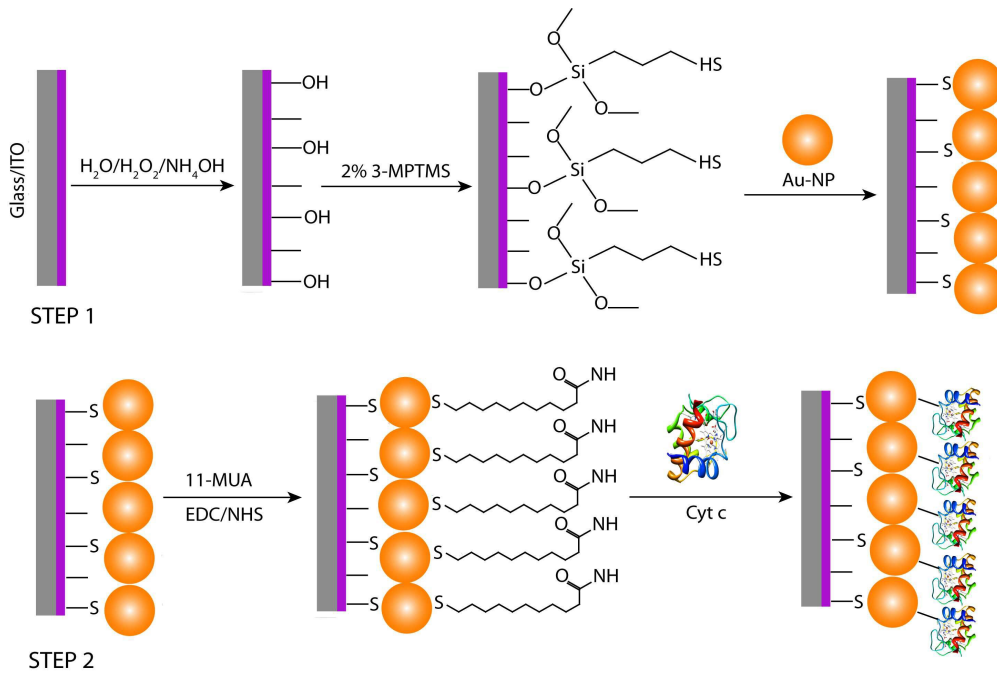
[0082]

[0083] 참고문헌

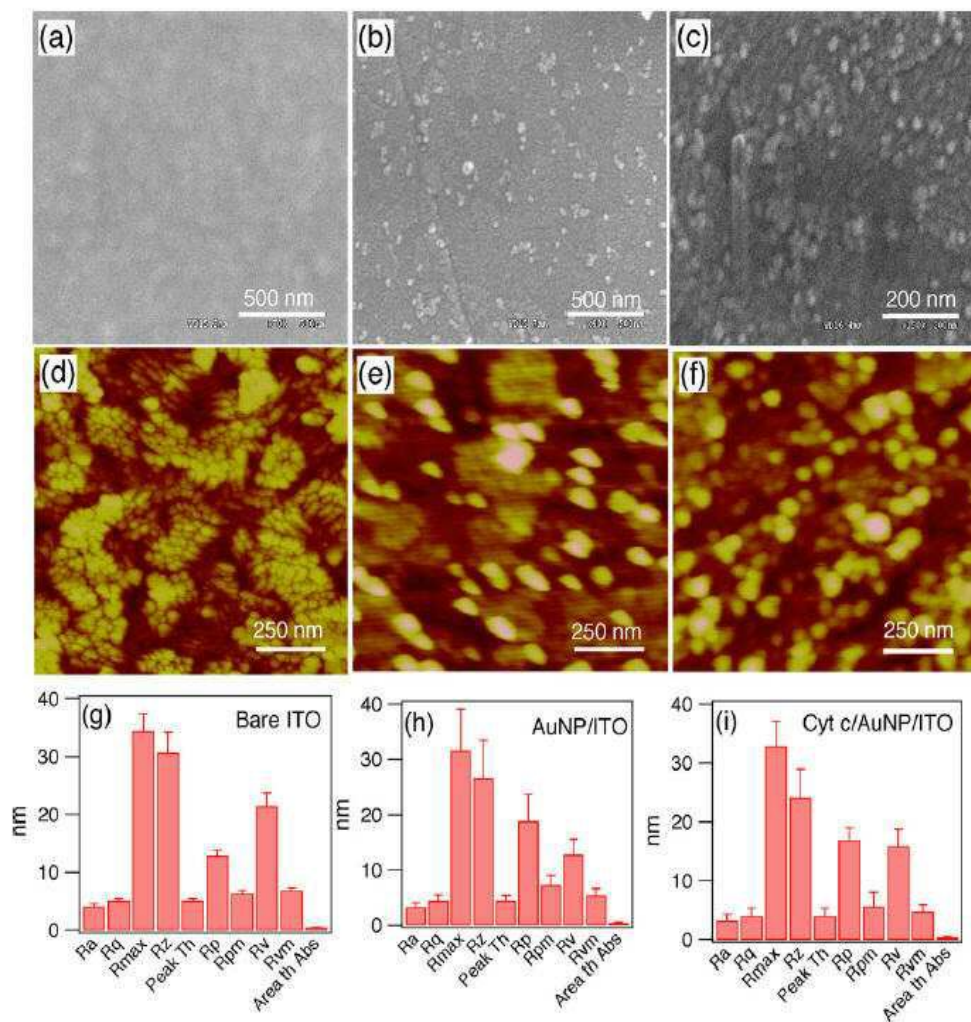
- [0084] [1] P.N. Bartlett, P.R. Birkin, J.H. Wang, F. Palmisano, G.D. Benedetto, Anal. Chem. 70 (1998) 3685.
- [0085] [2] J. Wang, Y. Lin, L. Chen, Analyst 118 (1993) 277.
- [0086] [3] T.T. Gu, Y. Hasebe, Biosens. Bioelectron. 21 (2006) 2121.
- [0087] [4] S. Chen, R. Yuan, Y. Chai, L. Zhang, N. Wang, X. Li, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 1268.
- [0088] [5] D. Du, J. Ding, J. Cai, A. Zhang, Colloids Surf. B 58 (2007) 145.
- [0089] [6] F. Gao, R. Yuan, Y. Chai, S. Chen, S. Cao, M. Tang, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 407.
- [0090] [7] H. Qi, C. Zhang, X. Li, Sens. Actuators B 114 (2006) 364.
- [0091] [8] J. Jia, B. Wang, A. Wu, G. Cheng, Z. Li, S. Dong, Anal. Chem. 74 (2002) 2217.
- [0092] [9] A. Lindgren, T. Ruzgas, L. Gorton, E. Csoregi, G.B. Ardila, I.Y. Sakharov, I.G. Gazaryan, Biosens. Bioelectron. 15 (2000) 491.
- [0093] [10] B.-H. Liu, F. Yan, J.-L. Kong, J.-Q. Deng, Anal. Chim. Acta 386 (1999) 31.
- [0094] [11] E.E. Ferapontova, V.G. Grigorenko, A.M. Egorov, T. Borchers, T. Ruzgas, L. Gorton, Biosens. Bioelectron. 16 (2001) 147.
- [0095] [12] S.Q. Liu, H.X. Ju, Anal. Biochem. 307 (2002) 110.
- [0096] [13] H.Y. Gu, A.M. Yu, H.Y. Chen, J. Electroanal. Chem. 516 (2001) 119.
- [0097] [14] S. Liu, Z. Dai, H. Chen, H. Ju, Biosens. Bioelectron. 19 (2004) 963.
- [0098] [15] J.-J. Feng, G. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, Anal. Biochem 342 (2005) 280.
- [0099] [16] L. Chen, G. Lu, J. Electroanal. Chem. 597 (2006) 51.
- [0100] [17] S.K. Arya, A.K. Prusty, S.P. Singh, P.R. Solanki, M.K. Pandey, M. Datta, B.D. Malhotra, Anal. Biochem. 363 (2007) 210.
- [0101] [18] M. Zhang, Y. Wu, X. Feng, X. He, L. Chen, Y. Zhang, J. Mater. Chem. 20 (2010) 5835.
- [0102] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

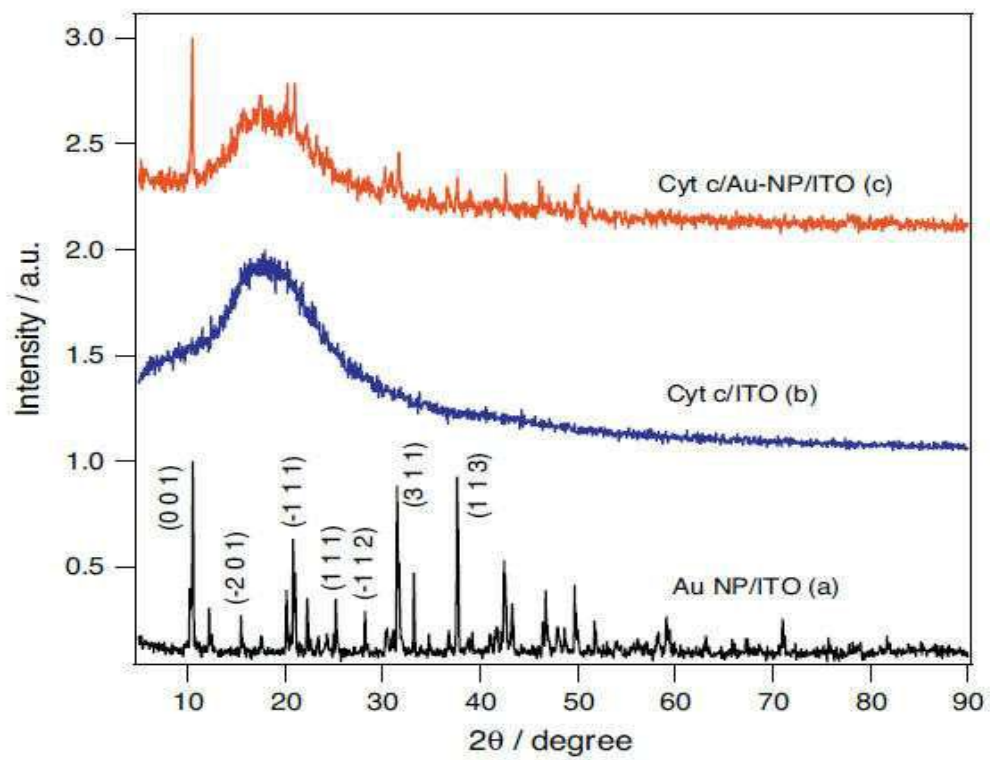
도면1



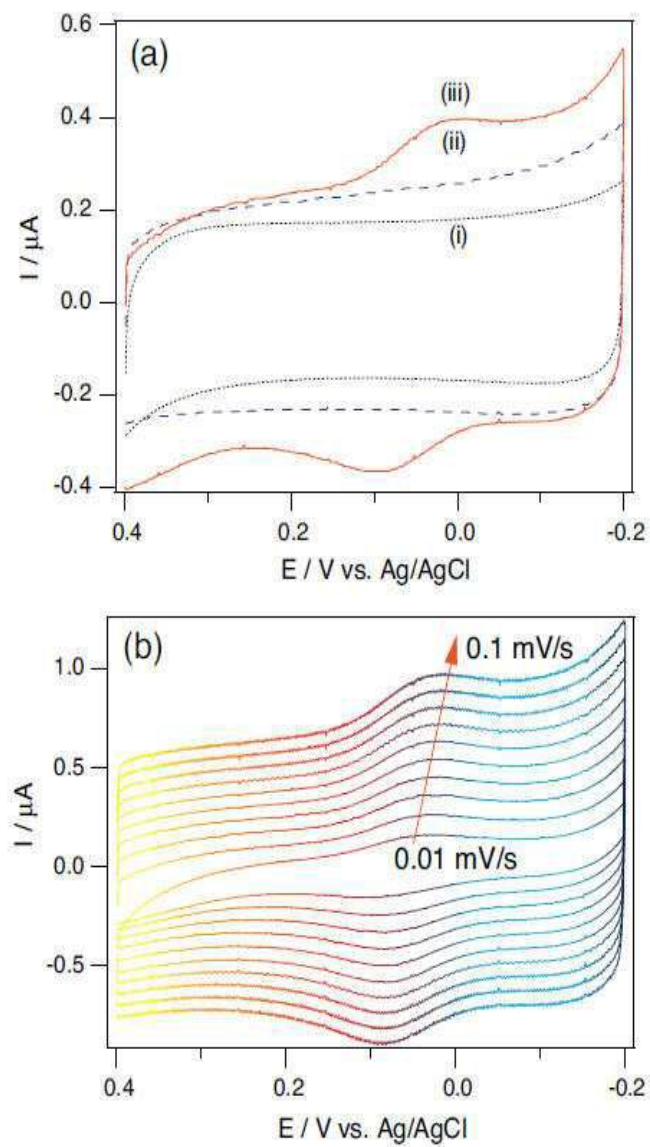
도면2



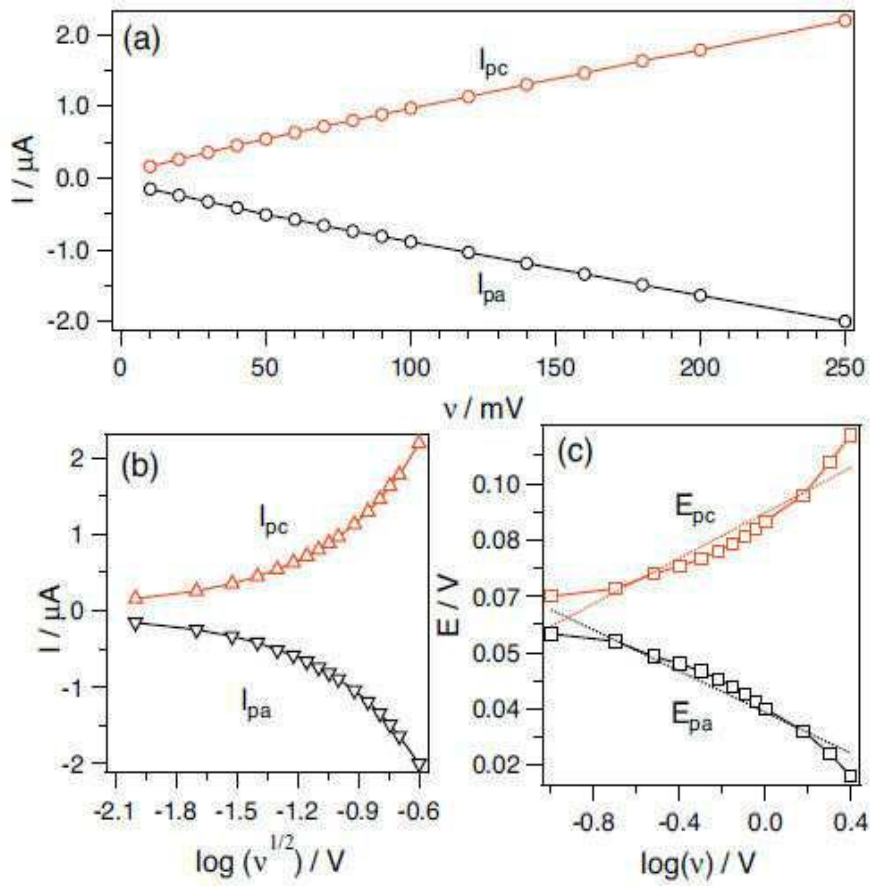
도면3



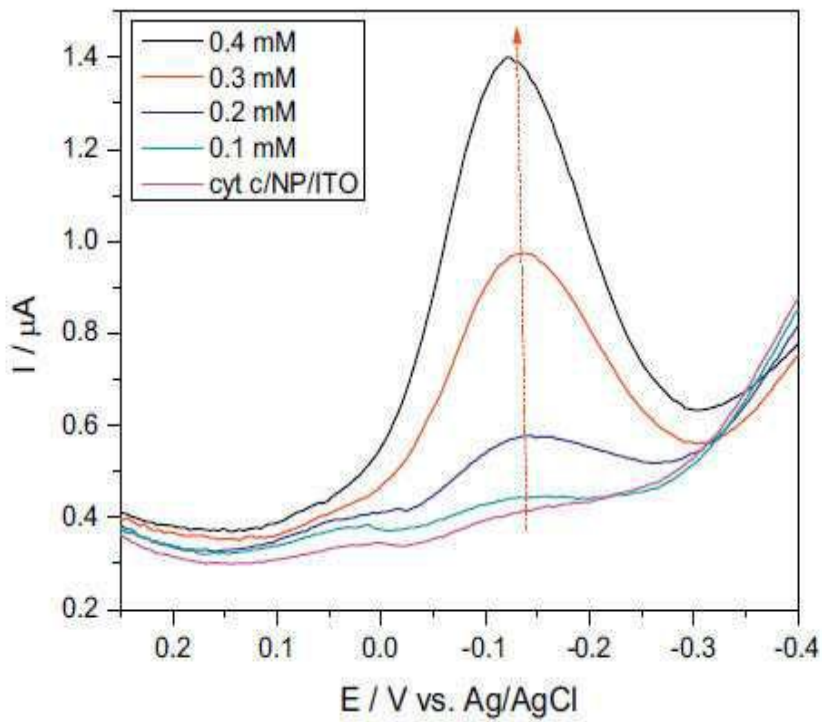
도면4



도면5



도면6



도면7

