



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월27일
(11) 등록번호 10-0841778
(24) 등록일자 2008년06월20일

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0014007

(22) 출원일자 2007년02월09일

심사청구일자 2007년02월09일

(56) 선행기술조사문헌

Biosens Bioelectron. Vol.22(11):2464-2470
(Epub 2006.10.12.)

US05522978 A1

US20020090738 A1

(73) 특허권자

부산대학교 산학협력단

부산 금정구 장전동 산30 부산대학교 내

(72) 발명자

심윤보

부산 금정구 장전2동 581번지 경보아파트 813호

(74) 대리인

장한특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

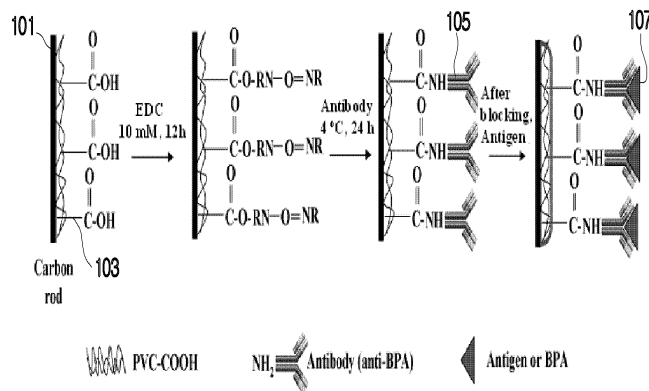
심사관 : 신원혜

(54) 비스페놀A 검출용 전위측정식 면역센서 및 이를 이용한검출방법

(57) 요약

본 발명은 비스페놀A 검출용 전위측정식 면역센서 및 이를 이용한 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비스페놀A 유사체와 단백질과의 결합체로 면역반응 시킨 생쥐로부터 분리한 폴리클론항체를 이온선택성 전극막에 고정시키며, 상기 이온선택성 전극막이 카르복시폴리염화비닐로 코팅된 것을 특징으로 하는 전위측정식 면역센서를 이용하면 비스페놀A를 별도의 표식물질 없이도 직접적으로 간단하고 저렴한 비용으로 검출할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

비스페놀A 유사체와 단백질과의 결합체로 면역반응 시킨 생쥐로부터 분리한 폴리클론항체를 이온선택성 전극막에 고정시키며, 상기 이온선택성 전극막은 카르복시폴리염화비닐 5 내지 33 중량% 및 2-니트로페닐옥틸에테르 67 내지 95 중량%로 구성된 혼합물을 전극에 가하고 건조시킨 것을 특징으로 하는 비스페놀A 검출용 전위측정식 면역센서.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 비스페놀A 유사체는 히드록시페닐발레인산, 2,4-디니트로페놀, p-니트로페놀, o-니트로페놀, 2,6-디메틸페놀 및 2,4-디클로로페놀로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 비스페놀A 검출용 전위측정식 면역센서.

청구항 3

삭제

청구항 4

비스페놀A 유사체와 단백질의 결합체를 제조하는 단계;

상기 결합체로 면역반응 시킨 생쥐로부터 폴리클론항체를 제조하는 단계;

카르복시폴리염화비닐전극 막을 제조하는 단계;

상기 카르복시폴리염화비닐전극 막에 상기 폴리클론항체를 고정하는 단계;

상기 카르복시폴리염화비닐전극 막에 남아있는 비특이적 폴리클론항체의 흡착을 제거하는 단계; 및

비스페놀A와 폴리클론항체 간의 항원항체반응을 수행하는 단계를 포함하고,

상기 카르복시폴리염화비닐전극 막은 카르복시폴리염화비닐 5 내지 33 중량% 및 2-니트로페닐옥틸에테르 67 내지 95 중량%로 구성된 혼합물을 전극에 가하고 건조시킨 것을 특징으로 하는 비스페놀A의 검출방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 결합체는 비스페놀A 유사체의 카르복시기를 활성화하는 단계 및 상기 활성화된 비스페놀A 유사체의 카르복시기와 단백질의 아민기를 공유결합하는 단계를 거쳐 제조되는 것을 특징으로 하는 비스페놀A의 검출방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 활성화는 카르보디이미드 또는 N-히드록시숙신이미드에서 선택된 하나 이상의 화합물에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 비스페놀A의 검출방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <10> 본 발명은 인간혈청시료 등에 존재하는 흔적량의 비스페놀A를 별도의 표식물질 없이도 직접적으로 간단하고 저렴한 비용으로 검출할 수 있는 비스페놀A 검출용 전위측정식 면역센서 및 이를 이용한 검출방법에 관한 것이다.
- <11> 비스페놀A는 내분비장애물질(endocrine-disrupting compound; EDC)로서 내분비호르몬, 에스트로겐 및 안드로젠과 유사한 효과를 나타낸다. 따라서 많은 동물의 생식기 계통뿐만 아니라 중추신경계에도 영향을 미친다.
- <12> 이는 에폭시코팅 및 폴리카보네이트와 같은 물질로 포장된 음식을 고품질로 생산하는데 있어서 중요한 단량체이

다. 고분자의 불완전한 중합이나 부분적인 가수분해 때문에 비스페놀A는 포장물질로부터 음식물로 이동한다. 음식물오염은 제쳐놓더라도 환경오염물질로써 염려되는 비스페놀A가 강의 퇴적물에서 나타나고 있다는 점은 큰 문제가 되고 있다.

- <13> 인간에게는 피부를 통한 비스페놀A의 흡수가 신장, 간, 비장, 췌장 및 폐에 커다란 손상을 줄 수 있다. 이와 같이 비스페놀A의 광범위한 영향으로 인해 그것이 인간에게 미치는 효과가 큰 걱정으로 부각되어 왔다. 따라서 정밀하고, 선택적이며, 비용이 덜 드는 분석방법이 크게 요구된다.
- <14> 가장 흔히 사용되어 온 비스페놀A의 검출방법은 질량분석법과 접목된 가스크로마토그래피(GC-MS), 질량분석법과 접목된 액체크로마토그래피(LC-MS), 형광검출법 및 효소결합면역흡수법(enzyme linked immunosorbent assays; ELISA)이다.
- <15> 크로마토그래피방법들은 매우 정밀하고 정확하지만, 시간소요가 큰 전처리단계가 필요하고, 다수의 시료들을 신속히 처리하기 어렵다는 문제가 있다.
- <16> 형광 방법은 시간소요가 큰 다단계의 분석이 필요하기 때문에 다른 기술들에 비해 더 문제가 많다. 게다가 이 장비들은 복잡하고, 고가이며, 즉각적인 현장 측정이 어렵다.
- <17> 전통적인 면역분석법은 복잡한 다단계 과정이 있고, 장황하고 고가라서 현 상태에서 사용되기에는 아직 어렵다.
- <18> 따라서 비스페놀A를 원상태에서 검출할 수 있는 정밀하고, 선택적이며, 비용이 덜 드는 면역센서의 개발이 요구된다.
- <19> 단백질을 검출하기 위해서 직접 및 간접의 전기화학적 기술에 기초한 두 가지 방식의 면역분석방법이 사용되어 왔다. 그러나 대부분의 간접방법은 시간이 많이 소요되고, 복잡하다는 문제가 있다.
- <20> 이와는 반대로 표식이 없는 직접 센서장치는 장점이 많다. 직접의 전기화학적 기술은 전극표면에 면역복합체의 형태로 전위, 전기용량 및 전도성변화의 측정에 기초한다. 이런 직접 면역센서의 가장 큰 장점은 반응기에서의 특이한 항원-항체 결합반응을 통해서 분자인식을 얻을 수 있는 단일단계의 시약 없는 분석이라는 점이다.
- <21> 전위측정식 면역센서는 비스페놀A의 검출을 위한 다른 전기화학적 기술들을 대신할 기술로서, 상기 기술들 중에서 가장 간단하고, 저렴한 비용의 기술이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <22> 이에, 본 발명에서는 비스페놀A 유사체와 단백질과의 결합체로 면역반응 시킨 생쥐로부터 분리한 폴리클론항체를 이온선택성 전극막에 고정시키며, 상기 이온선택성 전극막이 카르복시폴리염화비닐로 코팅된 것을 특징으로 하는 비스페놀A 검출용 전위측정식 면역센서를 개발하고자 한다.
- <23> 따라서 본 발명의 목적은 표식물질을 사용하지 않고 직접적으로 간단하고 저렴한 비용으로 비스페놀A를 검출할 수 있는 전위측정식 면역센서 및 이를 이용한 검출방법을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <24> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 비스페놀A 유사체와 단백질과의 결합체로 면역반응 시킨 생쥐로부터 분리한 폴리클론항체(polyclonal antibody; PAb)를 이온선택성 전극막에 고정시키며, 상기 이온선택성 전극막이 카르복시폴리염화비닐(carboxylated poly(vinyl chloride); PVC-COOH)로 코팅된 것을 특징으로 하는 비스페놀A 검출용 전위측정식 면역센서를 제공한다.
- <25> 상기 비스페놀A 검출용 전위측정식 면역센서는 카르복시폴리염화비닐이 코팅된 이온선택성 전극막; 및 상기 카르복시폴리염화비닐의 카르복실기와 공유결합에 의해 고정되는 폴리클론항체층으로 구성된다.
- <26> 폴리클론항체를 생산하기 위한 항원으로 비스페놀A를 단독으로 사용하게 되면 면역반응을 개시할 수 없어 단백질과의 결합체를 사용해야 한다. 그러나 비스페놀A의 히드록시기 중 하나와 단백질의 아미노기 간의 결합 시 비스페놀A의 구조가 변화되어 낮은 선택성을 나타내게 되는 문제가 있다.
- <27> 이에, 본 발명에서는 비스페놀A가 아닌 비스페놀A 유사체로서 예를 들어, 히드록시페닐발레인산(hydroxyphenylvaleric acid)의 말단에 있는 카르복실기를 이용하여 단백질과 결합시키고, 이렇게 얻어진 결합체를 항원으로 사용하여 폴리클론항체를 생산함으로써 비스페놀A 사용으로 인한 문제를 해결하고자 한다.

- <28> 상기 비스페놀A 유사체로는 히드록시페닐발레인산, 2,4-디니트로페놀, p-니트로페놀, o-니트로페놀, 2,6-디메틸페놀 및 2,4-디클로로페놀로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 사용하며, 바람직하게는 히드록시페닐발레인산을 사용한다.
- <29> 또, 상기 단백질로는 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA), 헤모시아닌, 오브알부민 등을 사용하며, 바람직하게는 소혈청알부민을 사용한다.
- <30> 또, 상기 이온선택성 전극막은 카르복시폴리염화비닐, 2-니트로페닐 옥틸 에테르(2-nitrophenyl octyl ether; NPOE)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질을 사용하며, 바람직하게는 카르복시폴리염화비닐 5 내지 33 중량%와 2-니트로페닐옥틸에테르 67 내지 95 중량%로 구성된 혼합물을 테트라히드로퓨란 등의 비극성 유기용매 군에서 선택된 어느 하나의 용매에 용해시키고, 상기 혼합용액을 전극에 가하고 건조시켜서 제조한다.
- <31> 본 발명에 따른 전위측정식 면역센서에 있어서, 면역센서의 표면은 주사전자현미경(scanning electron microscopy; SEM), X선광전자분광기(X-ray photoelectron spectroscopy; XPS), 미량수정저울(quartz crystal microbalance; QCM) 및 전기화학적 임피던스 분광기(electrochemical impedance spectroscopy; EIS)를 사용하여 측정된다.
- <32> 본 발명에서는 전위측정식 방법을 이용하여 비스페놀A를 측정하는 간단하고 직접적인 면역센서를 개발하고자 한다. 상기 전위측정식 방법은 면역반응 전후에 센서탐지기와 기준전극 간의 전위차를 측정하는 방법이다.
- <33> 아미드결합 형태를 통해서 이온선택성 전극막에 항체를 고정시키기 위해서 카르복실기가 유도된 폴리염화비닐을 사용한다. 상기 면역센서는 카르복시폴리염화비닐이 코팅된 탄소전극에 폴리클론항체를 고정시켜 제조한다.
- <34> 또한, 본 발명은 비스페놀A 유사체와 단백질의 결합체를 제조하는 단계; 상기 결합체로 면역반응 시킨 생쥐로부터 폴리클론항체를 제조하는 단계; 카르복시폴리염화비닐전극 막을 제조하는 단계; 상기 카르복시폴리염화비닐전극 막에 상기 폴리클론항체를 고정하는 단계; 상기 카르복시폴리염화비닐전극 막에 남아있는 비특이적 폴리클론항체의 흡착을 제거하는 단계; 및 비스페놀A와 폴리클론항체 간의 항원항체반응을 수행하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 비스페놀A의 검출방법을 제공한다.
- <35> 상기 결합체는 비스페놀A 유사체의 카르복실기를 활성화하는 단계 및 상기 활성화된 비스페놀A 유사체의 카르복실기와 단백질의 아민기를 공유결합하는 단계를 거쳐 제조되며, 이때 활성화는 카르보디이미드 또는 N-히드록시숙신이미드에서 선택된 하나 이상의 화합물에 의해 수행된다.
- <36> 그 후 활성화된 카르복시폴리염화비닐전극을 완충용액으로 씻어내고, 4℃에서 희석된 폴리클론항체가 담긴 인산완충액에서 24시간동안 배양한다. 상기 항체는 폴리클론항체의 아민기와 카르복시폴리염화비닐의 활성화된 카르복실기 간의 공유결합을 통해 카르복시폴리염화비닐전극에 직접 고정된다.
- <37> 그 다음에 폴리클론항체가 고정된 카르복시폴리염화비닐(PAb/PVC-COOH)전극을 인산완충액으로 완전히 세정하여 약하게 흡착된 항체를 제거한다. 결국 PAb/PVC-COOH를 인산완충액(PBSTG)에서 배양하고 소혈청알부민용액에서 반응시켜 비특이적으로 흡착된 항체를 제거한다.
- <38> 이하, 하기 실시 예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시 예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- <39> <실시예 1> 전위측정식 면역센서 제작
- <40> 1) 항원의 준비
- <41> 4,4-비스(4-히드록시페닐)발레인산[4,4-bis(4-hydroxyphenyl)valeric acid; BHPVA]를 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA)과 결합시켜 생쥐의 면역화에 이용하였다.
- <42> BHPVA와 BSA를 결합하기 위하여, 먼저 NHS(N-hydroxysuccinimide) 및 EDC[1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide]를 이용하여 BHPVA의 카르복실기를 활성화시켰다. 즉, 7.0 mg의 BHPVA, 3.5 mg의 NHS 및 5.9 mg의 EDC를 칭량하여 디메틸설폭사이드(DMSO) 1.0 ml에 용해시키고 2시간 동안 교반하면서 반응을 수행하였다.
- <43> BSA 용액은 0.1 M NaHCO₃ 용액(HCl을 이용하여 용액의 pH를 7.0으로 조정함) 4.0 ml에 45 mg의 BSA를 용해시켜 제조하였다. BSA 용액에 BHPVA-NHS-EDC 용액을 한방울씩 가하면서 교반하고, 25℃의 온도에서 2시간 동안 반응을 수행한 후, 4℃에서 24시간 동안 0.01 M PBS로 투석하였다. 또, 상기 용액을 물을 8번 바꿔가며 48시간 동

안 순수로 투석하였다. 마지막으로, 상기 용액을 동결건조하여 얻은 백색결정을 -20℃에서 보관하였다.

<44> 2) 폴리클론항체의 생산 및 정제

<45> 4주령 Balb/C 생쥐 3마리를 면역화를 위해 사용하였다. 각 생쥐에 프로인트완전보조제(Freund's complete adjuvant; FCA)에 현탁된 BHPVA-BSA 결합체 4 mg을 0일째, 11일째, 23일째, 34일째 총 4회에 걸쳐 복강내 주사하여 면역화하고 45일째 꼬리정맥에서 채혈하였다.

<46> 첫번째 면역반응은 프로인트불완전보조제(Freund's incomplete adjuvant; FIA)에 현탁된 BHPVA-BSA 결합체 0.5, 1.0 및 1.5mg을 각각 항원으로 이용하였고, 항혈청의 항체가(titre)는 마이크로플레이트에 코팅된 BHPVA-BSA를 이용하여 ELISA로 측정되었다. 그 결과 얻어진 폴리클론항체를 변형된 카프릴산이 포화된 황산암모늄염(modified caprylic acid-saturated ammonium sulfate; SAS)으로 정제하였다.

<47> 3) 센서탐지기의 변형

<48> 33.0 중량%의 PVC-COOH과 67.0 중량%의 NPOE를 1ml의 테트라히드로퓨란(tetrahydrofuran; THF)용액에 용해하였다. 상기 혼합용액 10ml를 탄소전극(직경; 4.8mm)에 가하고, 실내온도에서 24시간동안 건조시켰다.

<49> 그 다음에 PVC-COOH이 코팅된 전극을 10.0mM의 EDC를 함유하는 0.1 M의 인산완충용액(pH 7.0)에 담구어 PVC-COOH막에 있는 카르복실기를 활성화하였다.

<50> EDC에 의해 활성화된 PVC-COOH이 코팅된 전극을 인산완충용액으로 세척한 후, 4℃, PAb가 1:500의 희석된 0.1 M PBS(phosphate buffered saline)용액(pH 7.4)에서 24시간동안 반응시켰다.

<51> PVC-COOH의 카르복실기와 PAb의 아민기 간의 공유결합을 통해서 항체를 직접 PVC-COOH가 코팅된 전극에 고정시켰다. PAb가 흡착된 PVC-COOH 코팅전극(PAb/PVC-COOH)의 제조과정은 도1에서 나타낸 바와 같다.

<52> 상기 PAb/PVC-COOH을 0.1 M PBS용액(pH 7.4)으로 세정하여 약하게 흡착된 항체를 제거한 후 10mM의 PBSTG 용액(0.05% 트윈20 및 0.8% 젤라틴을 함유한 PBS 용액)에서 3시간 동안, 0.2% BSA 용액에서 실내온도로 2시간 동안 반응시켜 비특이적 흡착을 제거하였다.

<53> 이러한 전극을 PBS용액으로 세정하고 5℃에서 보관하였다.

<54> 이하, 센서탐지기와 기준 전극간의 전위 차이는 15 주파수대의 pH/Ion m의 KST101(Kosentech. Co., Korea)을 사용하여 측정하였다. Ag/AgCl(in saturated KCl)과 PAb/PVC-COOH/탄소 전극을 각각 기준전극 및 작동전극으로 이용하였다.

<55> <실시예 2> SEM에 의한 막 표면의 검토

<56> SEM 사진들은 Hitachi model S-4200(Japan)장비를 이용하여 측정하였다.

<57> PVC-COOH로 코팅된 표면은 5~33중량%까지 조성비의 변화 및 5~15ml까지 탄소 전극에 가해진 막 용액의 부피의 변화를 통해 검사하였다. 도2는 막 조성비와 막 용액의 부피를 변화시켰을 때, 표면이 변경된 막을 SEM 사진들을 통해 나타낸 것이다.

<58> 1) PVC-COOH의 조성비에 따른 SEM 사진

<59> 도2a는 코팅되지 않은 탄소 전극의 SEM 사진을 보여준다. 코팅되지 않은 탄소 전극의 표면은 매우 거칠고, 많은 홀을 가지고 있다는 것을 볼 수 있다. PVC-COOH막으로 코팅된 표면이 5~33중량%까지 증가되는 PVC-COOH 조성비의 양만큼 더 부드럽고, 더 균일하게 나타났다. {도2(b-d)} 막 조성비가 33중량%이상에서는 표면은 더 조밀하게 되었다. 따라서 33중량%의 막 조성비가 본 실험에서 사용되었다.

<60> 2) PVC-COOH용액의 부피에 따른 SEM 사진

<61> 탄소 전극에 가해진 PVC-COOH용액(조성비 33중량%)의 부피의 효과는 5ml~15ml사이에서 검사하였다. 이것은 도 2(e-h)에서 보여준다. SEM상에서 나타난 것처럼 막의 바람직한 표면적용범위는 PVC-COOH용액 10ml에서 나타났다. 따라서 10ml의 부피용액이 PVC-COOH전극의 제조에 사용되었다.

<62> PVC-COOH막의 두께는 광학현미경으로 0.1mm로 측정되었다. 최적의 조성비와 부피에서 PVC-COOH막 넓은 표면영역이 관찰되었고, 이는 많은 양의 효소를 PVC-COOH막에 고정시키는 또 다른 이점이다.

<63> <실시예 3> 공유결합에 의한 PVC-COOH에 PAb 고정화의 XPS분석

- <64> VG Scientific Escalab 250 XPS 분광계 (단색화된 Al K α 광원 (KBSI Busan, Korea))를 사용하여 ESCA(Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) 실험들을 수행하였다. 도3(a는 C 1s, b는 N 1s, c는 O 1s)은 PVC-COOH(검은선)과 PAb/PVC-COOH(회색선)의 변경된 표면에 대한 XPS분석들을 보여준다.
- <65> 1) PVC-COOH의 C 1s 스펙트럼 검토
- <66> PVC-COOH의 C 1s 스펙트럼은 284.4 eV, 285.8 eV 및 288.2 eV에서 세군데 피크를 나타냈고, 각각 C-H, C-Cl 및 O-C=O에 상당한다(Applied Surface Science, 252, 5076-5082, 2006). PVC-COOH막에 PAb가 고정된 후에 C-N결합에 상당하는 286.2 eV에서 새로운 피크가 관찰되었는데, 이는 288.2 eV에서의 O-C=O 피크는 높은 에너지로 급격히 변화하였다.
- <67> C-H, C-Cl 및 O-C=O 피크들의 효력은 PAb의 고정화 후에 감소되었고, 이것은 PVC-COOH의 표면부분이 PAb에 의해 덮여졌다는 것을 가리킨다. 이 결과로 PAb가 PVC-COOH의 카르복실기와 PAb의 아민기간에 아마이드 결합의 형태를 통해서 성공적으로 PVC-COOH막에 고정되었다는 것을 알 수 있다(Anal. Chem., 77, 4854-4860, 2005).
- <68> 2) PVC-COOH의 N 1s 스펙트럼 검토
- <69> PVC-COOH막에 대한 N 1s 스펙트럼에서는 피크가 없었다. 이것은 아민기의 결핍으로 인한 것이다. 그러나 N 1s 스펙트럼에서는 항체의 고정화 후에 399.9 eV에서 명확한 피크가 관찰되었다. 이것은 앞선 연구에서 관찰된 것처럼 전도성 고분자의 작용된 카르복실기에 공유결합을 통해서 효소가 고정화 되는 동안의 C-N결합에 상응한다(Anal. Chem., 77, 4854-4860, 2005).
- <70> 3) PVC-COOH의 O 1s 스펙트럼 검토
- <71> PVC-COOH의 O 1s 스펙트럼은 531.9 eV 및 533.2 eV에서 두 개의 피크가 나왔는데, 각각 C=O 및 C-O에 상응한다. PVC-COOH의 533.2 eV에서 C-O 피크가 사라진 것은 카르복실기와 아민기간에 아마이드 결합의 형태가 C-O결합을 통해서 발생했다는 것을 나타낸다. 이것은 항체가 성공적으로 PVC-COOH에 고정되었다는 것을 더욱 명확히 해주는 자료이다.
- <72> <실시에 4> PAb가 고정화 전후의 임피던스 스펙트럼 분석
- <73> 임피던스 스펙트럼은 EG&G PAR 273A potentiostat/galvanostat와 퍼스널컴퓨터와 결합된 락인 증폭기(PAR EG&G, Model 5210)를 가지고 측정하였고, 주파수는 100kHz에서 10Hz 또는 100Hz까지 10개당 5 포인트를 얻는 개회로전압에서 검사하였으며, 10mV의 싸인전압 진폭이 사용되었다. PAb 고정화 전후의 임피던스 스펙트럼을 분석하였다.
- <74> 도4Aa는 pH 7.0에서 PAb 고정화 전(사각형으로 나타냄)후(원으로 나타냄)의 bode plot을 나타낸 것이다. 카르복시폴리염화비닐 전극의 임피던스 값은 도4Aa에서 보여 지듯이 PAb 고정 후에 증가하였다. PVC-COOH막에 PAb의 고정화는 막 두께의 증가로 인한 전극/전해물의 접점에서 두 배의 충전층에 따른 PVC-COOH막의 저항증가를 가져왔다.
- <75> 따라서 임피던스 값은 PAb 고정화 후에 증가하였다. PAb 고정화 전후의 임피던스 값의 최대차이는 도4Ab에서 보여지는 4.1 Hz의 로그주파수에서 나타났다.
- <76> PAb 고정화 전후의 Nyquist plot에서 전하이동저항이 PAb의 고정화 후에 증가하였다는 것이 명백히 나타났다. 일반적인 등가 회로는 도4Ac에 나타난 것과 같이 현재 시스템의 표본 임피던스 스펙트럼에 유용하였다.
- <77> R₁, α , R₂ 및 Q_{dl}요소들의 값은 실험데이터를 조정함으로써 측정되었다. R₁은 용액저항, R₂는 분극저항, Q_{dl}은 이중층의 위상정수인자를 나타낸다. 항체 고정화 전의 R₁, α , R₂ 및 Q_{dl}의 값은 각각 1268 Ωcm^2 , 0.83, $1.10 \times 10^5 \Omega\text{cm}^2$ 및 $5.75 \times 10^{-6} \Omega\text{cm}^2\text{s}^B$ 이었다.
- <78> 그러나 항체 고정화 후의 R₁, α , R₂ 및 Q_{dl}의 값은 각각 1704 Ωcm^2 , 0.82, $1.31 \times 10^5 \Omega\text{cm}^2$ 및 $6.77 \times 10^{-6} \Omega\text{cm}^2\text{s}^B$ 이었다. R₂값은 증가했고, Q_{dl}값은 감소했다. 이것은 PAb가 성공적으로 PVC-COOH막에 고정화 되었다는 것을 나타낸다.
- <79> <실시에 5> PAb의 고정화와 PAb와 비스페놀A간의 상호작용동안의 QCM 분석

<80> QCM(quartz crystal microbalance) 실험은 SEIKO EG&G model QCA 917 및 PAR model 263A potentiostat/galvanostat(USA)를 이용하여 수행되었다. AU 작동전극(area:0.196cm²; 9MHz; AT-cut quartz crystal)이 QCM실험에 사용되었다.

<81> PVC-COOH가 코팅된 표면에 PAb의 양을 측정하고 비스페놀A와 고정화된 PAb의 상호작용을 검사하기 위해서 QCM검사가 수행되었고, 이는 도4B에서 나타난다.

<82> 1) PAb가 PVC-COOH에 고정되는 동안의 QCM 분석

<83> PVC-COOH막을 AU 수정의 한 면에 코팅하였고, PVC-COOH의 카르복실기가 EDC와 함께 반응하였다. 도4Ba는 PAb가 PVC-COOH막에 고정되는 동안의 주파수변화를 보여준다.

<84> 상기 주파수는 시간이 흐를수록 감소하였고, 이것은 PVC-COOH막 표면에 항체의 고정화가 일어났다는 것을 가리킨다. 항체 고정화의 경우에 주파수의 감소는 1시간 반 안에 정상상태에 도달했다. 이것은 PVC-COOH막에 항체의 고정화가 1시간 반 안에 완전히 수행된다는 것을 의미한다.

<85> 전체 주파수 변화(Δf)는 50Hz이었다. 질량변화(Δm)는 하기 수학적 식 1(Anal. Chem., 75, 1123-1129, 2003)을 사용하여 45±5ng으로 측정되었다. 표면을 변형한 항체를 가지고 비스페놀A의 특이한 상호작용을 검사하기 위해서 PAb/PVC-COOH 변형수정전극의 비특이적 결합을 PBSTG와 0.2 중량%의 BSA용액을 가지고 방해하였다.

<86> [수학적 식 1]

$$\Delta m = \Delta f \cdot H_2 \times 5 \cdot 608 \text{ (ng/cm}^2\text{)} / H_2 \times 0.196 \text{cm}^2$$

<87> <88> 2) PAb/PVC-COOH 전극생성 중 QCM 분석

<89> 같은 완충액을 가지고 세정한 후, PAb/PVC-COOH 전극을 각각 QCM세포에서 비스페놀A가 결핍된 용액(도4Bb)과 존재하는 용액(도4Bc)으로 나누어 담갔다.

<90> 도4Bb에서와 같이 비스페놀A가 없는 용액의 주파수 반응은 어떤 변화도 없었다. 즉 아무런 비특이적 흡착이 없었다는 것을 의미한다. 도4Bc는 비스페놀A(30ng/ml)와 PAb/PVC-COOH의 상호작용동안에 주파수 변화를 나타낸 것이다.

<91> 주파수 변화의 급속한 감소가 폴리클론항체-비스페놀A 상호작용에 대해서 측정되었다. 상기 주파수 감소는 약 35분 후에 정상상태에 도달하였고, 이는 10Hz 이었다. 면역상호작용 후에 관찰된 질량변화는 9±1.2ng 이었다.

<92> <실시예 6> 실험인자의 최적화

<93> 면역센서의 검사성능을 최적으로 하기 위해서 매개물의 pH, 온도 및 이온선택성 전극의 반응에 대한 항체농도의 효과는 조사하여야 한다. 도5a에서 보여지듯이, 전위차는 매개물의 pH가 5.8에서 7.4가 될 때까지 증가되었고, 이후 pH가 7.4를 넘어서서는 전위차가 감소되었다. 그 감소는 알칼리성의 매개물에서 항체가 낮은 활성을 보였기 때문일 수 있다. 이 점에서 항원검출을 위해서 pH는 7.4가 바람직하다.

<94> 그러나 전위차는 pH 7.4~8.6 범위에서는 확연히 감소하지는 않았다. 물에서 비스페놀A를 검출해야 하는 점을 고려할 때, 측정된 실험은 pH 7.4에서 수행되었다.

<95> 또한 전위차에 있어서 항체농도의 효과는 항체/PVC-COOH 전극에서 검토되었다. 도5b에서 알 수 있듯이, 전위차는 항체농도가 증가한 만큼 증가하였다. 최대전위차는 항체희석비율이 1:500인 점에서 측정되었다. 더 희석된 농도는 본 연구에서는 고려하지 않았다. 이와 같이, 항체/PVC-COOH의 제조는 1:500비율로 희석된 용액에서 수행되었다.

<96> 전위차에 대한 온도의 효과를 보면 도5c에서 전위차는 15~25℃까지의 온도에 따라 증가하고, 25℃를 넘어서면서 감소하였다. 이것은 항체의 열적 비활성화와 관련이 있다. 따라서 25℃가 바람직하다.

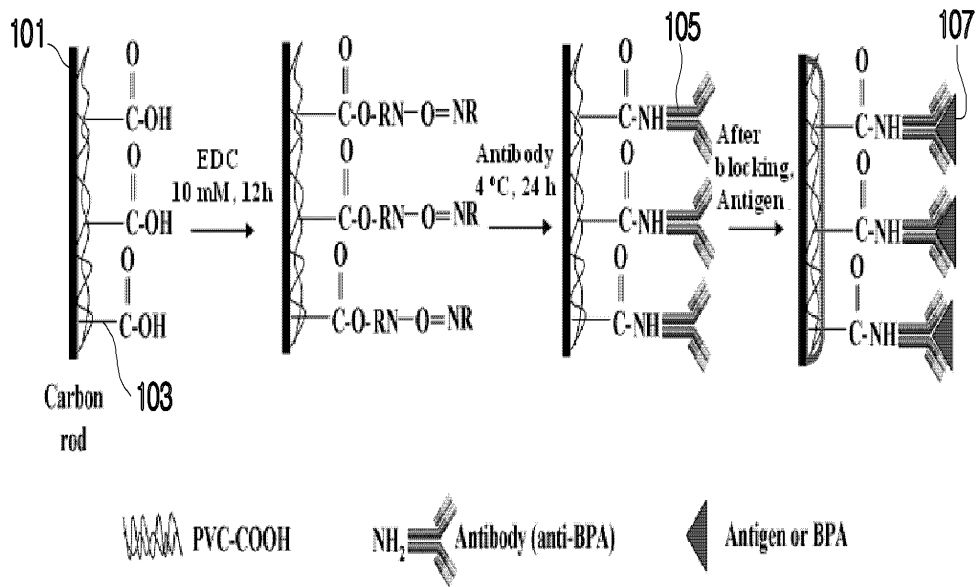
<97> <실시예 7> 캘리브레이션 플롯

<98> 최적 조건에서의 비스페놀A의 양적 검출은 비스페놀A의 농도증가에 따른 전위 차이를 측정함으로써 평가되었다. 도6은 비스페놀A의 검출에서 전위차를 보여준다.

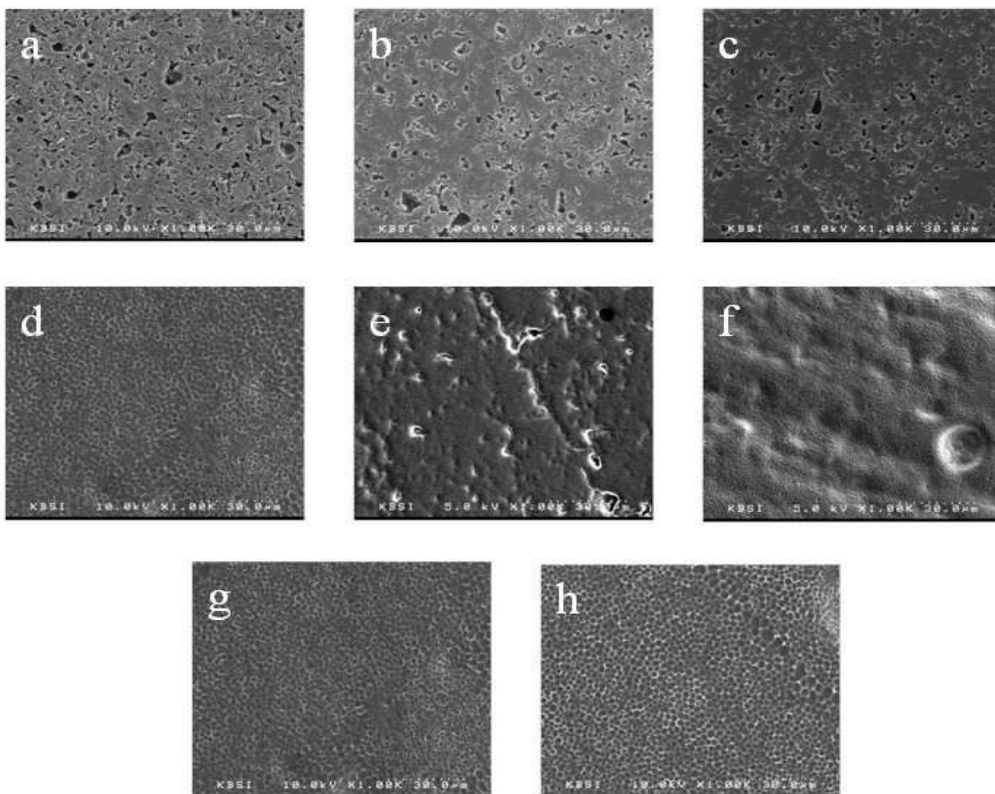
<99> 본 발명의 면역센서는 전위차와 비스페놀A의 농도 간에 선형관계를 보여준다. 그 선형역학적 범위는 1~30ng/ml 였다. 이 플롯의 기울기는 0.996의 상관계수를 가지고 0.6698mV/ng/ml로 측정되었다. 비스페놀A에 대한 전극의

도면

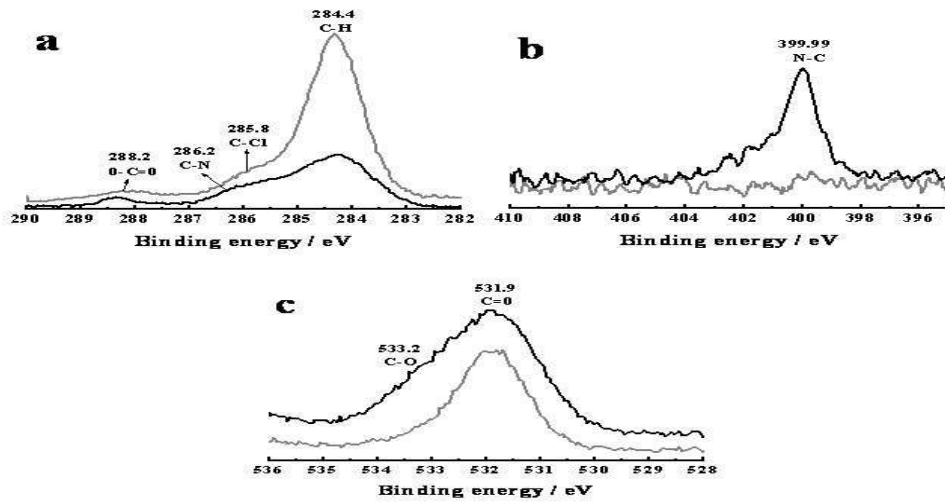
도면1



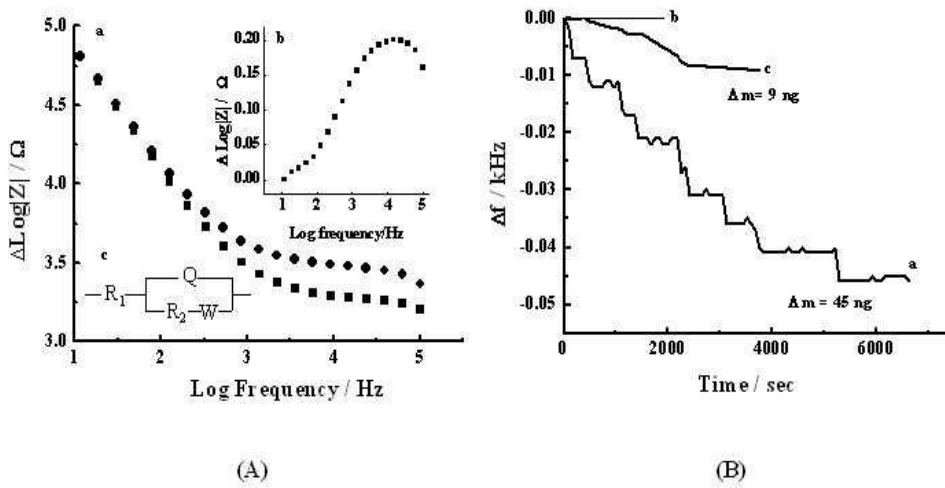
도면2



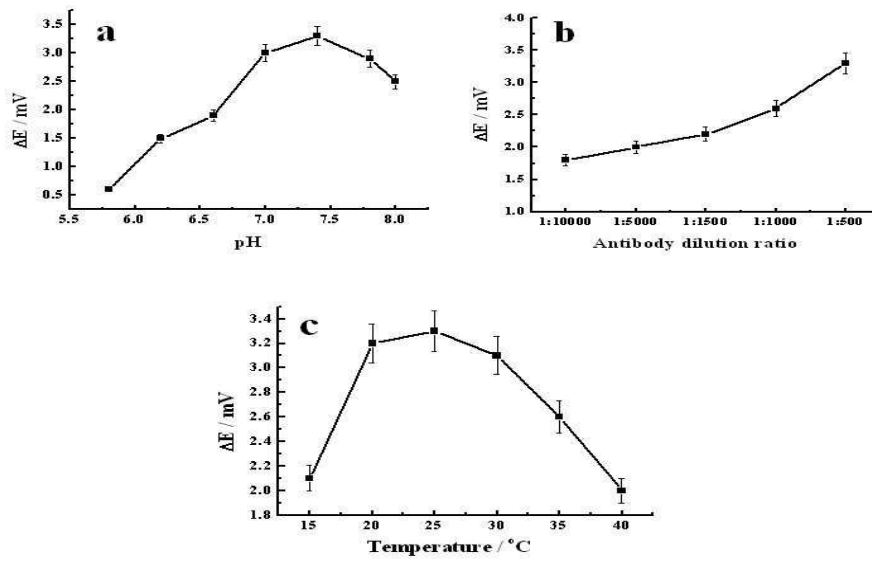
도면3



도면4



도면5



도면6

