



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0112875
(43) 공개일자 2015년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 27/327 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/66 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 27/3271 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0042538

(22) 출원일자 2015년03월26일

심사청구일자 없음

(30) 우선권주장

1020140036876 2014년03월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인

에스케이이노베이션 주식회사

서울특별시 종로구 종로 26 (서린동)

국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

신홍주

울산광역시 울주군 범서읍 구영로 75-25, 103-804
(울산구영동문굿모닝힐)

임영진

부산광역시 사하구 다대낙조1길 42, 102-1301 (다대동, 성원아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 플러스

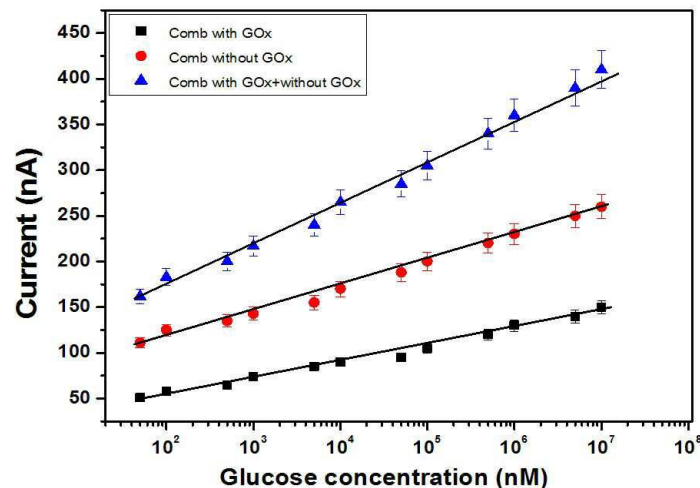
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 이중 전극쌍을 이용한 전기화학 바이오 센서

(57) 요약

본 발명은 전기화학 센서에 관한 것으로, 상세하게는 링커를 통하여 표면이 개질된 활성 표면을 포함하는 작용 전극과, 보조 전극으로 이루어진 센싱 시스템을 이용한 전기화학 바이오 센서에 관한 것이다. 본 발명의 센서는 종래의 센서 대비 높은 전류값을 가지며, 안정성 및 감응도가 우수하여 다양한 종류의 생체물질의 센싱을 위해 용이하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C12Q 1/001 (2013.01)
C12Y 101/03004 (2013.01)
G01N 27/3273 (2013.01)
G01N 33/53 (2013.01)
G01N 33/573 (2013.01)
G01N 33/66 (2013.01)
G01N 2800/042 (2013.01)

답터 샤마

대한민국 689-852 울산광역시 울주군 범서읍 모두
 박1길 19 은샘아트빌 201

(72) 발명자

이윤정

전라북도 전주시 완산구 신봉로 64, 2동 501호 (
 효자동1가, 광진진주아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A1A2009711
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	기본연구지원사업
연구과제명	단일세포 연구를 위한 이중 탄소 원형 나노전극이 집적된 AFM 프루브 개발
기 여 율	1/1
주관기관	국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

유체 중의 분석물의 존재 또는 농도를 결정하기 위한 전기화학 센서로서,
기관; 및
상기 기관 상에 형성되며, 링커(linker)를 통하여 효소가 부착된 작용 전극을 포함하는 전기화학 센서.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 링커는 상기 전극 상에 직접 형성된 나노입자 상에 부착된 전기 화학 센서.

청구항 3

제 2항에 있어서,
상기 나노입자는 금, 백금 또는 팔라듐으로부터 선택되는 전기 화학 센서.

청구항 4

제 1항에 있어서,
상기 센서는 상기 작용 전극과 상기 기관의 수평 방향으로 이격되어 형성된 보조 전극을 더 포함하는 전기 화학 센서.

청구항 5

제 1항에 있어서,
상기 작용 전극은 상기 기관으로부터 수직 방향으로 이격되어 형성되며, 메시(mesh) 형상을 가지는 전기 화학 센서.

청구항 6

제 5항에 있어서,
상기 센서는 상기 작용 전극 하부에 상기 작용 전극과 이격되어 형성된 보조 전극을 더 포함하는 전기 화학 센서.

청구항 7

제 1항에 있어서,
상기 링커는 디아조니움, 디아조니움 염 또는 그 유도체를 포함하는 표면 개질 베이스 물질의 작용 그룹을 아민 그룹으로 변환한 후 디알데히드 가교 시약을 혼합하여 형성되는 전기 화학 센서.

청구항 8

기관 상에 전극을 형성하고,
상기 전극 상에 표면 개질 베이스 물질을 형성하고,
상기 표면 개질 베이스 물질과 가교 시약을 반응시키고,
상기 반응된 가교 시약과 효소를 반응시켜, 상기 효소를 상기 전극 상에 부착하는 것을 포함하는 전기 화학 센서의 제조 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 표면 개질 베이스 물질은 디아조니움(diazonium), 디아조니움 염 또는 그 유도체인 전기 화학 센서의 제조 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 표면 개질 베이스 물질은 4-니트로페닐 디아조니움 테트라플루오로보레이트(4-NP)인 전기 화학 센서의 제조 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 가교 시약은 디알데히드인 전기 화학 센서의 제조 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 가교 시약은 글루타르알데히드(glutaraldehyde)인 전기 화학 센서의 제조 방법.

청구항 13

제 8항에 있어서,

상기 전극 상에 나노입자를 형성하는 것을 더 포함하며,

상기 표면 개질 베이스 물질은 상기 나노입자 상에 직접 형성된 전기 화학 센서의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 전기화학 센서에 관한 것으로, 상세하게는 링커를 통하여 표면이 개질된 활성 표면을 포함하는 작동 전극과, 보조 전극으로 이루어진 센싱 시스템을 이용한 전기화학 바이오 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

생명과학에서 나노의학에 대한 목표 중 하나는 다양한 생물학적 공정을 실험실 내에서 연구할 수 있으며, 나노 물질들이 호환가능하다는 점이다. 대부분의 생물학적 공정들이 생체 내에서의 전자의 이동을 수반하기 때문에 전기화학 분야의 관심의 대상이 되고 있다. 상기 분야에서 나노물질과 함께 효소 또는 다른 생체 물질을 결합시킨 새로운 형태의 전기화학 바이오센서의 개발의 중요성이 부각되고 있다. 글루코스는 생물학에서 아주 흔한 연료로 미생물로부터 인간까지 대부분의 생물체에서 에너지 원료로서 사용되고 있다. 인간의 혈액에서 글루코스의 농도는 4.4 내지 6.6 mM로 구성된다. 따라서, 혈액, 소변 및 다른 체액에서 글루코스의 연속적인 정량 검출 방법을 개발하는 것이 필요하다. 비정상적인 글루코스 레벨의 향상이 당뇨병을 초래하기 때문에, 글루코스의 검출은 중요한 요소이다. 현재까지, 글루코스 센싱을 위하여 폴리아닐린(polyaniline), 폴리파이롤(polypyrrole) 또는 폴리인돌(polyindole)과 같은 다양한 전도성 고분자가 사용되었다. 그러나, 이와 같은 방법은 많은 시간을 필요로 하고 제조 단가를 상승시키는 복잡한 화학 합성을 수반한다. 이와 함께, 자가조립단층(self-assembled monolayer, SAM)은 글루코스 옥시다제(glucose oxidase)의 공유결합을 위해 널리 사용된다. 그러나, 글루코스 센서의 민감도는 일반적으로 SAMs의 낮은 안정성과 제한된 전위창(potential window)의 절충에 의한 것이다. 따라서, 이러한 SAMs의 제약을 극복하기 위해서, 탄소 전극에서 아릴 디아조니움(aryl diazonium) 염의 환원적 흡착법 연구가 이루어졌다. 상기 연구는 모든 종류의 탄소 표면(유리 탄소, 흑연, 표면 인쇄 전극 탄소 나노튜브, 다이아몬드) 뿐만 아니라 금속, 실리콘 및 인듐 틴 옥사이드(indium tin oxide)에서 센싱하기 위해 적용될 수 있다. 디아조니움 염의 전기화학적 환원은 생체분자 고정화를 위해 탄소 전극에서 다양한 기능성 그룹을 형성하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 그러나, 나노크기의 전극에 디아조니움 염을 흡착시키는 것은 여전히 과제

로 남아 있다.

[0003] 글루코스 센서에 대한 대부분의 최근 연구들은 대한민국 공개공보 제2000-0008880호와 같이, 글루코스의 글루코노락톤 (gluconolactone)으로의 산화를 촉진하는 글루코스 산화효소(glucose oxidase) 또는 대한민국 공개공보 제2010-0131495호 및 대한민국 공개공보 제2005-0019139호와 같이 글루코스 탈수소효소와 같은 효소의 고정에 기반을 두고 있다. 대부분의 경우 효소를 기반으로 한 센서는 센서의 감도와 선택도를 향상시키기 위해 전하전달자를 필요로 한다. 그러나, 전류측정 효소 전극은 상대적으로 낮은 출력 전류 및 감응도를 가지며, 반응시간이 지연되는 문제점이 있다.

[0004] 특히, 당뇨병 환자의 혈액속의 혈당물질인 글루코스 측정 시에는 혈액속의 여러 가지 간섭물질인 이온 끌림 현상을 극 저전압(0.055V이하)의 인가에 의해 저지시키면서도 빠른 효소산화반응을 유도할 수 있어야 함에 따라, 저전압 인가시의 높은 전류 밀도 및 우수한 감응도를 갖는 글루코스 센서의 개발이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 2000-0008880 A (2000.02.15).
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 2010-0131495 A (2010.12.15).
(특허문헌 0003) 대한민국 공개특허공보 2005-0019139 A (2005.02.28).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 높은 출력 전류밀도를 가지며, 전하의 이동이 극히 원활하고, 높은 비표면적을 가지며, 감응도가 우수한 나노전극이 구비된 글루코스 센서를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은
[0008] 유체 중의 분석물의 존재 또는 농도를 결정하기 위한 전기화학 센서로서,
[0009] 기관; 및
[0010] 상기 기관 상에 형성되며, 링커(linker)를 통하여 효소가 부착된 작용 전극을 포함하는 전기화학 센서에 관한 것이다.
[0011] 상기 전기화학 센서는 P개($P \geq 1$ 이상인 자연수)의 작용 전극이 종 또는/및 횡으로 배열된 매트릭스를 이룰 수 있다.
[0012] 단일 전극 표면의 생체분자 고정화는 전극과 효소 간의 직접적인 전자 전달을 가능하게 해 준다. 도 1은 글루코스 옥시다제(glucose oxidase)로 코팅된 단일 전극을 사용하여 글루코스 센싱을 기술하는 개략도를 나타내고 있다. 도 1에서 표본 용액의 글루코스와 'O'로 표기된 산소가 글루코스 옥시다제 존재하에 반응하여 글루코노락톤(gluconolactone)과 'Red'로 표기된 과산화수소(hydrogen peroxide)를 생산한다. 상기 과산화수소의 산화 전류를 수집함으로써, 전극에서 글루코스의 농도를 측정할 수 있다. 수소가 전극에서 산화된 후, 생성물인 산소는 효소 사이트로 이동되어 환원 반응을 거친다. 이와 같은 산화환원 반응의 반복을 통해 전류 레벨(current level)이 증가될 수 있다. 그러나, 일반적으로 이와 같은 전략을 사용하여 얻은 전류 레벨은, 효소 코팅과 한정된 전극의 면적으로 인해 표면 반응성이 감소함으로써 매우 낮아진다. 따라서, 높은 전류 레벨을 얻기 위해 전극의 기하학적 구조 연구를 필요로 한다.
[0013] 산화환원 전류의 레벨을 향상시키기 위하여 IDA(interdigitated array) 나노전극에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 전극은 탄소, 금, 백금, 팔라듐, 전도성 고분자 등의 다양한 종류의 전도성 물질을 사용하여 제조될 수 있다. IDA 나노전극은 두 가지의 빗-형태(comb-shaped)의 전극으로 구성된다. 도 2에서와 같이 임의의 전기화학적 가역 산화환원 종(redox species)은 전극 사이에서의 산화환원 반응을 재활용하게 되고, 이를 통해 재활

용 횡수에 따라 전류 신호가 증가하게 된다. 산화환원 순환(redox cycling)에 의한 전류 신호 증폭은 전극간 산화환원 종의질량 전달에 의존한다. 특히 마이크로/나노 전극에 있어서의 확산(diffusion)을 통한 질량 전달은 전극 사이의 간극을 감소시키고 전극의 종횡비(aspect ratio)를 증가시킴에 따라 향상될 수 있다.

[0014] 산화환원 매개체는 전기화학 센서를 이용하여 다양한 분자들을 검출하는 동안 중요한 역할을 수행한다. 상기 매개체는 전기화학-효소 산화환원 순환을 통해 효소 및 전극 사이에서 전자들을 중재한다. 글루코스 옥시다제(glucose oxidase, GOx) 반응 기작에 있어, 산소는 환원된 형태의 GOx와 매우 빠르게 반응하여 반응의 부산물로 과산화수소를 생산한다. 여기서 산소는 루테늄(ruthenium), 헥사민 복합체(hexamine complex), 페리시아니드(ferricyanide), 페로세네메탄올(ferrocenemethanol) 및 페로세네모노카르복실산(ferrocenemonocarboxylic acid) 등 다양한 형태의 산화환원 매개체로 대체될 수 있다. 상기 전자 매개체는 전극 외부 표면에서의 빠른 전자-전달 반응과 산화환원 효소와의 빠른 전자 전달 반응을 거친다. 예를 들어, 페리시아니드를 이용한 산화환원 반응은 다음과 같이 일어날 수 있다.

[0015] [화학식 1]

[0016] $\text{Glucose} + \text{GOx(FAD)} \rightarrow \text{Gluconic acid} + \text{GOx(FADH}_2\text{)} + 2\text{H}^+$

[0017] [화학식 2]

[0018] $\text{GOx(FADH}_2\text{)} + [\text{Fe(CN)}_6]^{3-} \rightarrow \text{GOx(FADH)} + [\text{Fe(CN)}_6]^{4-} + \text{H}^+$

[0019] [화학식 3]

[0020] $\text{GOx(FADH}_2\text{)} + [\text{Fe(CN)}_6]^{3-} \rightarrow \text{GOx(FADH)} + [\text{Fe(CN)}_6]^{4-}$

[0021] 본 발명에서 상기 링커는 제한되지는 않으나 상기 전극 상에 직접 형성된 나노입자 상에 부착될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 상기 나노입자는 제한되지는 않으나 금, 백금 또는 팔라듐으로부터 선택할 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 양태는, 상기 센서는 상기 작용 전극과 상기 기관의 수평 방향으로 이격되어 형성된 보조 전극을 더 포함하는 전기화학 센서에 관한 것이다.

[0024] 본 발명에서, 상기 작용 전극 1개와 보조 전극 1개의 쌍을 단위체로 하여 본 발명의 전기화학 센서는 $M(M \geq 1 \text{인 자연수}) \times N(N \geq 1 \text{인 자연수})$ 개의 단위체를 포함할 수 있으며, 종방향으로 M개의 단위체가 이격 배열되고, 횡방향으로 N개의 단위체가 이격 배열되어, $M \times N$ 매트릭스를 이룰 수 있다.

[0025] 도 3에 나타난 것과 같이, 글루코스 옥시다제는 IDA 전극들 중 어느 하나(comb 1)에만 선택적으로 고정화될 수 있으며, 이를 통해 환원된 종은 어떤 물질로도 코팅되지 않아 표면이 보다 전기화학적으로 반응성이 높은 나머지 전극(comb 2)에서 보다 효율적으로 산화될 수 있다. 이를 통해 단일 전극 기반의 센싱에 비하여 고 신호 증폭이 가능해진다. 두 전극을 보다 가까이 위치시킬수록 전류 레벨이 향상될 수 있다. 효소는 아릴 디아조늄염을 환원시킴으로써 특정 전극에 선택적으로 고정화시킬 수 있다.

[0026] 상기 언급한 바와 같이 본 글루코스 센서에서 산소는 효소와 전극 사이에서 재활용될 수 있는 루테늄(ruthenium), 헥사민 복합체(hexamine complex), 페리시아니드(ferricyanide), 페로세네메탄올(ferrocenemethanol) 및 페로세네모노카르복실산(ferrocenemonocarboxylic acid) 등 다양한 형태의 산화환원 매개체로 대체될 수 있다. 상기 산화환원 종은 산소를 산화환원 종으로써 사용하였을 때 안정된 글루코스 센싱을 제한하는 가수분해 없이 전극 표면에서 전기화학적으로 반응할 수 있는 장점이 있다.

[0027] 본 발명에서, 상기 분석물-효소는 제한되지는 않으나:

[0028] 글루코스(glucose)-글루코스 옥시다제(glucose oxidase); 글루코스(glucose)-글루코스 디하이드로게나제(glucose dehydrogenase); 아데노신 트리포스페이트(adenosine triphosphate)-글루코스 옥시다제(glucose oxidase) 및 헥소키나제(hexokinase); 콜레스테롤(cholesterol)-콜레스테롤 옥시다제(cholesterol oxidase),

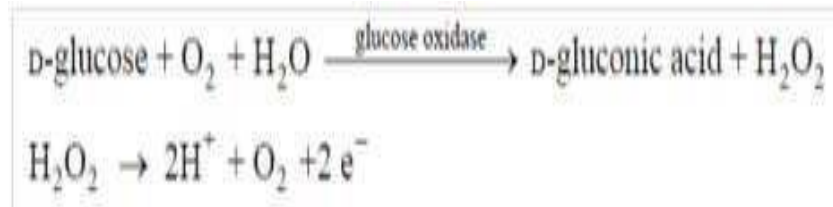
ChOx) 및 콜레스테롤 에스테라제(cholesterol esterase); 및 락테이트(lactate)-락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase);으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0029]

도 4에서와 같이 디아조니움 염 결합은 다양한 생체분자들의 결합을 가능하게 하는 -NH₂와 -COOH와 같은 전극 표면에 다양한 작용 그룹을 제공할 수 있다. 또한 도 5에서와 같이 디아조니움에 기반한 IDA 나노전극 상의 생체분자의 선택적 결합은 하기와 같이 다양한 타입의 분자 검출에 기여할 수 있다.

[0030]

(a) 글루코스 옥시다제(GOx)를 이용한 글루코스,



[0031]

[0032]

(b) 글루코스 옥시다제 및 헥소키나아제를 이용한 아데노신 트리포스페이트(adenosine triphosphate, ATP),



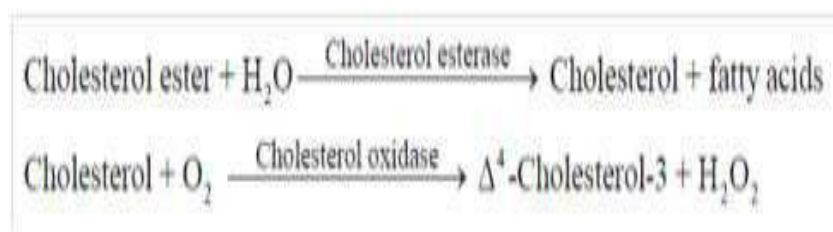
[0033]



[0034]

[0035]

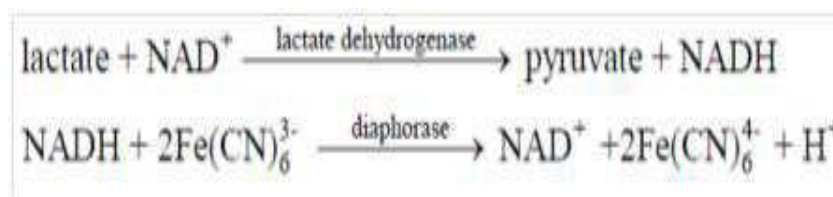
(c) 콜레스테롤 옥시다제(cholesterol oxidase, ChOx) 및 콜레스테롤 에스테라제(cholesterol esterase)를 이용한 콜레스테롤(cholesterol),



[0036]

[0037]

(d) 락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase)를 이용한 락테이트(lactate),



[0038]

[0039]

본 발명의 또 다른 양태는, 상기 작용 전극은 상기 기관으로부터 수직 방향으로 이격되어 형성되며, 메시(mesh)

형상을 가지는 전기화학 센서에 관한 것이다.

- [0040] 본 발명에서 상기 센서는 제한되지는 않으나 상기 작용 전극 하부에 상기 작용 전극과 이격되어 형성된 보조 전극을 더 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 메시 형상의 전극 형태로 제조된 전기화학 센서의 경우, IDA 나노전극을 사용한 경우에 비해, 산화환원의 순환(redox recycling)에 있어서 좋은 효율을 나타낼 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 링커는 디아조니움, 디아조니움 염 또는 그 유도체를 포함하는 표면 개질 베이스 물질의 작용 그룹을 아민 그룹으로 변환한 후 디알데히드 가교 시약을 혼합하여 형성되며 생체물질을 전극 표면에 부착시킬 수 있다.
- [0043] 또한 본 발명은
- [0044] 기관 상에 전극을 형성하고,
- [0045] 상기 전극 상에 표면 개질 베이스 물질을 형성하고,
- [0046] 상기 표면 개질 베이스 물질과 가교 시약을 반응시키고,
- [0047] 상기 반응된 가교 시약과 효소를 반응시켜, 상기 효소를 상기 전극 상에 부착하는 것을 포함하는 전기 화학 센서의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명에서 상기 표면 개질 베이스 물질은 제한되지는 않으나 디아조니움(diazonium), 디아조니움 염 또는 그 유도체를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 표면 개질 베이스 물질은 4-니트로페닐 디아조니움 테트라플루오로보레이트(4-NP)를 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 상기 가교 시약은 디알데히드계의 화합물인 경우 제한되지는 않으나, 일예로 글리옥살(glyoxal), 말론디알데히드(malondialdehyde), 숙신디알데히드(succindialdehyde), 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 및 프탈알데히드(phthalaldehyde) 등으로부터 선택하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 사용할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 다른 양태는, 상기 전극 상에 나노입자를 형성하는 것을 더 포함하며, 상기 표면 개질 베이스 물질은 상기 나노입자 상에 직접 형성된 전기 화학 센서의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명에서 상기 나노입자는 제한되지는 않으나, 바람직하게 금(gold), 백금(platinum) 또는 팔라듐(palladium)을 사용할 수 있다.
- [0052] 상기와 같은 나노입자의 코팅을 통해 IDA 나노 전극을 이용한 바이오 센싱을 수행함에 있어 전극 표면에 다양한 나노 입자를 도포함으로써 전기화학적으로 향상된 특성을 얻을 수 있다. 이를 통해 전극의 표면적과 반응성이 향상되어 전기화학적 신호의 향상을 가져올 수 있다.
- [0053] 본 발명에서, 상기 전극은 제한되지는 않으나 IDA(interdigitated array) 나노 전극을 사용할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서, 상기 작용 전극과 보조 전극 간의 거리는 제한되지는 않으나 10nm 내지 10 μ m의 범위일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 일 실시예에서 알 수 있는 바와 같이 상기와 같은 범위로 작용 전극과 보조 전극의 거리를 비치함에 따라, 산화환원 반응이 보다 원활하게 일어날 수 있게 되어, 높은 수준의 전류를 얻을 수 있었다.

발명의 효과

- [0056] 본 발명의 센서는 종래의 센서 대비 높은 전류값을 가지며, 안정성 및 감응도가 우수하여 다양한 종류의 생체물질의 센싱을 위해 용이하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 글루코스 옥시다제에 의해 기능화된 단일 전극을 이용한 글루코스 센싱의 모식도이다.
- 도 2는 (a) 얇은 밴드의 IDA 전극 및 (b) 높은 종횡비의 IDA 전극에서의 산화환원 순환의 모식도이다.

도 3은 글루코스 옥시다제에 의해 선택적으로 기능화된 IDA 전극을 이용한 글루코스 센싱의 모식도이다.

도 4는 디아조니움-변형된 전극을 이용한 효소 고정화이다.

도 5는 디아조니움 염을 이용한 생체분자의 선택적 고정을 위한 모식도이다.

도 6은 선택적 전극 기능화의 모식 공정도이다.

도 7은 스캔 속도 200 mV/sec에서 1 mM 4-니트로페닐 디아조니움 테트라플루오로보레이트(4-nitrophenyl diazonium tetrafluoroborate, 4-NP)와 0.1 M 테트라부틸암모늄 테트라플루오로보레이트 / 아세토니트릴(tetrabutylammonium tetrafluoroborate / acetonitrile) 용액에서 탄소 IDA 나노전극(comb 1)의 순환전압전류 곡선이다.

도 8은 스캔 속도 100 mV/sec, 0.1 M KCl + 탈이온화수/에탄올(9:1)에서 4-NP의 니트로 그룹(nitro group)을 아민 그룹(amine group)으로 환원시키기 위한 순환전압전류곡선이다.

도 9는 탄소 IDA 나노전극을 이용한 글루코스 농도에 따른 IDA 전극에서 수집된 산화전류 값을 나타낸 도면이다.

도 10은 금속 나노입자로 개질된 IDA 나노전극상에 생체분자를 고정화한 모식도이다. (A) 양쪽 전극이 모두 나노입자로 코팅된 경우, (B) 한쪽 전극(comb)만이 나노입자로 코팅된 경우.

도 11은 (a, b) 열분해 전에 적층된 고분자 세트의 SEM 이미지와 (c, d) 열분해 후의 상기 적층된 탄소 전극 세트의 SEM 이미지이다.

도 12는 효소로 선택적으로 개질된 적층된 전극 세트를 사용한 글루코스 센싱의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 본 발명을 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0059] (화학물질)

[0060] 아세토니트릴(acetonitrile; Fisher Scientific), 테트라부틸암모늄 테트라플루오로보레이트(tetrabutylammonium tetrafluoroborate, NBu₄BF₄; Fluka), 4-니트로페닐 디아조니움 테트라플루오로보레이트(4-nitrophenyl diazonium tetrafluoroborate, 4-NP), 포타슘 페리시아니드(pottassium ferricyanide), 포타슘 페로시아니드(pottassium ferrocyanide), 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 포타슘 클로라이드(pottassium chloride), 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride), 아스퍼질러스 니거(*Aspergillus niger*) 유래 글루코스 옥시다제(glucose oxidase; Type X-S, 100,000-250,000 units/g solid, Sigma Aldrich), 포스페이트 버퍼(phosphate buffer, PBS, pH 7.4; Life Technologies).

[0061] (제조예 1) 전극 제조(electrode fabrication)

[0062] 탄소 IDA 나노전극은 6 인치(100) 규소 웨이퍼(Si wafer) 상에 제조되었다.

[0063] 첫째로, 700 nm 두께의 이산화규소(SiO₂)층이 열산화(thermal oxidation)에 의해 규소 웨이퍼 상에 용착되었다. 포토리소그래피(photolithography)를 이용하여 SU-8 음성 감광제(negative photoresist) IDA 구조를 패터닝하였다. 감광제 구조를 탄소 전극으로 변환하기 위해, 사전정의된 감광제 IDA 패턴을 진공상태, 900 ℃에서 열분해시켰다. 열분해 동안, IDA 구조의 크기가 폭이 60%, 높이가 90%만큼 감소하였다. 최종적으로, 탄소 전극은 맞물린(interdigitated) 전극 영역을 제외하고 부동태화(passivate)되었다.

[0064] (제조예 2) 선택적 표면 기능화(selective surface functionalization)

[0065] 도 6에서와 같이 효소의 고정화는 3 단계로 구성될 수 있다. 4-니트로페닐 디아조니움 테트라플루오로보레이트(4-NP)를 베이스로 사용하였다. 효소를 디아조니움에 연결하기 위해, 디아조니움의 작용 그룹을 아민그룹으로

변환시키고 디아조니움의 아민 그룹과 효소 사이에서 글루타르알데히드가 사용되었다.

[0066] 4-NP의 전기화학적 흡착

[0067] 탄소 전극의 전기화학적 개질은 0.1 M NBu_4BF_4 에 1 mM 4-NP를 포함하는 아세토니트릴에서, 기준전극 Ag/AgCl 에 대해 200 mV/s의 스캐닝 속도로 0.5에서 -0.7 V까지 전극의 전자전위를 스캔함으로써 측정하였다. 개질하기 전, 용매는 아르곤 가스를 이용하여 30분간 불순물을 제거하였다. 개질이 이루어진 후, 전극은 30분간 탈이온화수(DI water)로 세척하였다.

[0068] 니트로 그룹을 아민 그룹으로 환원

[0069] 니트로 그룹의 환원을 통한 아민 그룹의 생성을 위해 0.1 M 염화칼륨과 물/에탄올(90:10 v/v)를 함유한 프로톤 용매(protic solvent)를 사용하였다. 기준전극 Ag/AgCl 에 대해 100 mV/s의 스캐닝 속도로 0에서 0.8 V까지 전극의 전자전위를 스캔함으로써 전극의 전위를 측정하였다.

[0070] 효소 고정화

[0071] 링커를 통한 효소 고정화를 위해 글루타르알데히드를 이작용기 가교 시약(bifunctional cross-linking agent)으로 사용하였다. 아민 그룹 전환 이후, 탄소 IDA 전극을 0.1% 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride)와 2.5 중량% 글루타르알데히드 용액 200 μL 에 실온에서 2 시간 동안 담갔다 꺼냈다.

[0072] 이후 전극은 탈이온화수로 세정하고 질소 가스를 이용하여 건조하였다. 글루코스 옥시다제 효소를 탄소 전극상에 생성된 알데히드 그룹과 결합(coupling)시키기 위해, 상기 전극을 50 mM PBS 버퍼(pH 7.4)에 0.1% 소듐 시아노보로하이드라이드와 함께 10 mg/mL 글루코스 옥시다제를 포함하는 4 $^{\circ}\text{C}$ 버퍼 용액에서 하룻밤 배양하였다.

[0073] (제조예 3) 전극의 전기화학적 특성화

[0074] 모든 전극은 탈이온화수에 0.5 M의 염화칼륨과 10 mM의 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 에서 기준전극 Ag/AgCl 에 대해 50 mV/s의 스캐닝 속도로 0에서 0.6 V까지 전극의 전자전위를 스캔함으로써 순환전압전류법을 사용하여 특성화하였다. 글루코스 센싱은 05 mM PBS(pH 7.4)에서 산화환원 매개체로 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 을 이용하여 수행하였다.

[0075] 글루코스 용액은 100 mM PBS에 0.1 M의 농도로 준비되었고 아노머릭(anomeric) 평형에 도달하도록 24 시간 동안 실온에서 변선평화(mutarotate)를 허용하였다. 글루코스 센싱을 위한 모든 용액은 전기화학적 테스트를 수행하기 전에 최소 30분간 용액에 아르곤 가스를 배출하여 정화하였다. 대조전극으로는 백금선을 사용하였다. 전기화학적 검출은 다중 전위 측정기(CHI 1020; CH Instrument Inc., USA)를 이용하여 수행하였다.

[0076] (실시예 1) 탄소 IDA 나노 전극의 표면 개질

[0077] 상기 제조예 1의 절차에 의하여 탄소 IDA 나노 전극을 제작하였다. 도 3에 나타난 것과 같이 탄소 IDA 나노 전극에 대해 링커 및 효소를 이용하여 전극 표면을 기능화하였다. 탄소 IDA 나노 전극 중 한 콤(comb)은 글루코스 옥시다제(GOx)로 기능화한 반면, 다른 인접한 콤(comb)은 페로시아니드 산화환원 종의 산화 전류를 수집하기 위해 사용되었다.

[0078] 도 7에는 한 쪽 콤에 1 mM 4-NP 및 0.1 M NBu_4BF_4 /아세토니트릴 용액상에서의 순환전압전류 곡선(cyclic voltammogram)을 나타내었다. 첫 번째 사이클 -0.05 V에서 비가역적 환원 곡선은 디아조니움 염 유도체로부터 4-니트로페닐 라디칼(radical)의 형성에 기여하였다. 상기 첫 번째 비가역적 곡선이 두 번째 스캔에서 사라진 것으로부터, 탄소 표면에 접합된 니트로페닐 그룹이 전자 전달을 방해한다는 것을 의미하였다. 마지막 가역 곡선으로부터, 분열로 형성된 라디칼 음이온(radical anion)이 탄소 전극 표면에서 아릴 음이온(aryl anion)으로 환원되었음을 보여준다.

[0079] 제조예 2에서 니트로 그룹을 아민 그룹으로 환원시킨 결과를 도 8에 도시하였다. 환원 전류의 증가는 니트로 그룹이 아민 그룹으로 전환되도록 하였다.

[0080] 탄소 전극을 활성화시킨 아민 그룹은 2.5% 글루타르알데히드를 사용하여 글루코스 옥시다제와 함께 배양되었다. 마지막으로 탄소 IDA 나노전극 한쪽은 제조예 2 방법을 사용하여 글루코스 옥시다제로 기능화시키고, 인접한 전

극은 페로시아니드의 산화 전류를 수집하기 위해 사용되었다.

- [0081] (실시예 2) 글루코스 센싱
- [0082] 빠른 전자 전달 동특성(transfer kinetics)과 안정된 산화/환원 형태를 갖는 페리시아니드 산화환원 매개체(ferricyanide redox mediator) 존재하에 글루코스 센싱을 수행하였다.
- [0083] 효소 반응이 이루어지는 동안, 글루코스 분자는 글루코스 옥시다제 효소의 플라빈-아데닌 디뉴클레오타이드(flavin-adenine dinucleotide, FAD) 산화환원 핵심요소에 의해 산화되었다. 상기 산화 공정에서, FAD는 하기 [화학식 4]에 기술한 바와 같이 $\text{FADH}_2(\text{GOx}_{\text{red}})$ 로 환원되었다. 이 시스템에서 [화학식 5] 반응에서 산소는 대체 전자 수용체로 페리시아니드(ferricyanide)로 대체될 수 있다. 이후, FADH_2 는 [화학식 6~7]에서와 같이 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 이 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 로 환원되면서 FAD로 다시 산화되었다. 상기 반응은 글루코스 옥시다제로 기능화된 탄소 전극(comb 1)에서 일어난 반면, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 는 도 3에서 나타난 바와 같이 전극(comb 1) 및 인접한 탄소 전극(comb 2)에서 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 으로 다시 산화되었다. 상기 최종 단계의 반응은 매개체의 산화형태가 재생됨에 따라 글루코스 농도에 직접적으로 비례하여 측정가능한 전류를 생산하였다.
- [0084] [화학식 4]
- [0085] $\text{Glucose} + \text{FAD} \rightarrow \text{Gluconic acid} + \text{FADH}_2 + 2\text{H}^+$
- [0086] [화학식 5]
- [0087] $\text{FADH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{FAD} + \text{H}_2\text{O}_2$
- [0088] [화학식 6]
- [0089] $\text{FADH}_2 + [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} \rightarrow \text{FADH} + [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} + \text{H}^+$
- [0090] [화학식 7]
- [0091] $\text{FADH}_2 + [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} \rightarrow \text{FADH} + [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$
- [0092] 상기 결과로부터 효소와 두 탄소 IDA 나노전극 combs 사이에 산화환원 순환(redox cycling)이 발생하였다. 글루코스 옥시다제로 개질된 탄소 전극(comb 1)에서는 글루코스의 산화와 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 의 환원을 포함하는 효소 반응이 일어났다. 반면, 개질된 탄소 전극(comb 1)과 개질되지 않은 인접한 탄소 전극(comb 2)에서는 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 의 산화반응이 일어났다. 따라서, IDA 나노 전극의 두 전극 모두 페리시아니드의 산화환원 순환에 관여하고 있으며, 이는 글루코스 검출에 있어 높은 민감도를 부여하는 데 기여함을 알 수 있었다.
- [0093] 도 9에 IDA 나노 전극의 두 전극에서 글루코스 농도의 증가에 따라 전류가 선형적으로 증가함을 나타내고 있다. Comb 2에서의 전류는 Comb 1에서의 전류보다 큰데, 이는 Comb 2의 효소 사이트 사이의 거리와 전극 표면이 Comb 1에 비해서 큼에도 불구하고, Comb 2의 개질되지 않은 표면이 다수의 분자로 개질된 Comb 1에 비해 표면 반응성이 더 좋기 때문이다. 따라서, 추가로 개질되지 않은 탄소 전극을 사용한 IDA 나노 전극을 이용하여 보다 많은 전류의 수집이 가능하였다.
- [0094] (제조예 4) 금속 나노입자로 개질된 IDA(intergiditated array) 나노 전극을 사용한 바이오센서
- [0095] 제조예 1 및 제조예 2의 전극 제조 방법과 유사하게, 도 10과 같이 디아조니움 염을 이용한 링커를 탄소 전극에 부착시키기 전에 금(gold), 백금(platinum) 또는 팔라듐(palladium) 등의 나노입자를 코팅하여, 링커에 연결된

글루코스 옥시다제를 포함하는 생체분자가 나노입자를 통하여 전극과 연결되는 바이오 센서를 제작하였다.

[0096] (제조예 5) 적층된 탄소 전극 세트를 사용한 글루코스 센싱

[0097] 도 11에서와 같이 서스펜디드 카본 메쉬(suspended carbon mesh)와 기질-경계 평면 전극을 포함하는 적층된 전극 세트(stacked electrode set)를 상기 제조예 1 및 제조예 2에서 기술한 방법과 유사한 바이오센서 플랫폼으로서 사용하기 위한 IDA 전극을 대체하는 구성으로 제조하였다. 바이오센싱을 위한 산화환원 기작 및 제조 공정은 상기 제조예 1 내지 제조예 3에 기술한 방법을 사용하였다.

[0098] 이와 같이 제조한 적층된 전극 세트의 경우 IDA 나노전극을 사용한 경우에 비해 산화환원 순환에 있어 좋은 효율을 보이는 것을 확인하였다.

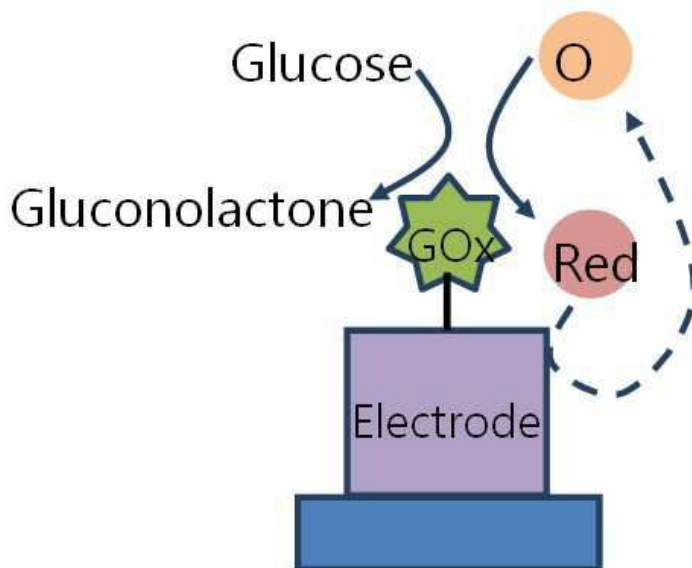
[0099] 글루코스 센싱을 위하여 서스펜디드 나노메쉬(suspended nanomesh)의 선택적 디아조늄 개질은 상기 제조예 2에서 기술한 4-NP의 전기화학적 환원 흡착에 의해 이루어졌다. 이후 글루타르알데히드를 사용하여 글루코스 옥시다제를 고정화하였다. 도 12(a)에서와 같이 평면 전극은 페리시아니드/페로시아니드 산화환원 커플의 산화환원 순환을 위해 아무런 개질 없이 남겨두었다.

[0100] 상기 제작한 전극과 다른 방법으로, 효소 고정화를 위하여 도 12(b)에 도시한 바와 같이 상기 제조예 2의 방법과 마찬가지로 기질-경계 평면 전극을 부착하여 개질하는 방법을 사용하여 전극을 제작하였다.

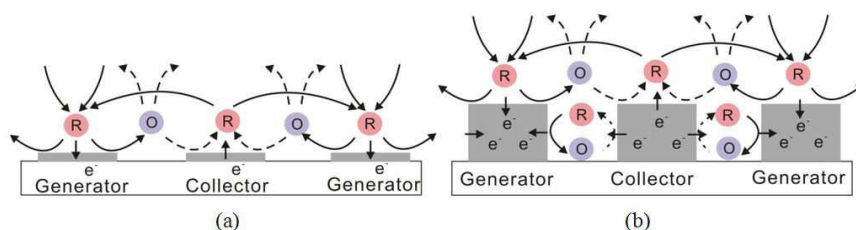
[0101] 도 12 (a), (b)에서 도시한 각각에 대하여, 효소와 전극 표면 사이에서 산화환원 커플(redox couple)이 재순환 되었으며, 전극 표면에서의 산화 전류를 측정하여 글루코스의 농도를 측정하였다.

도면

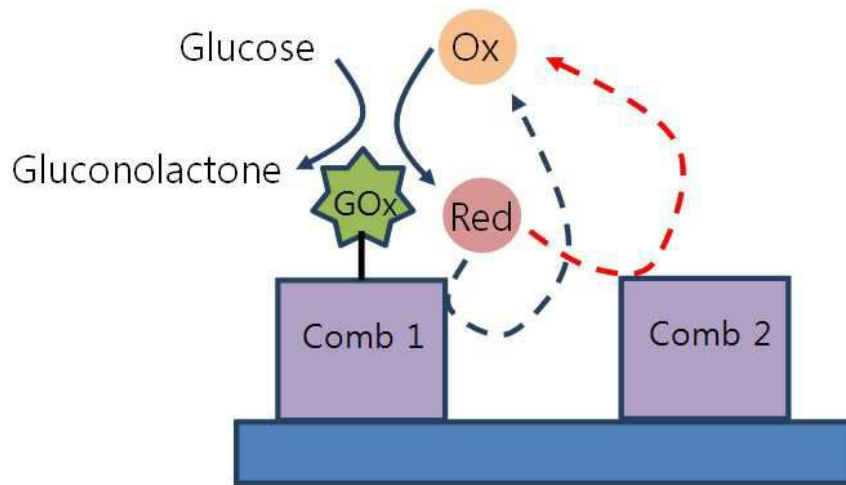
도면1



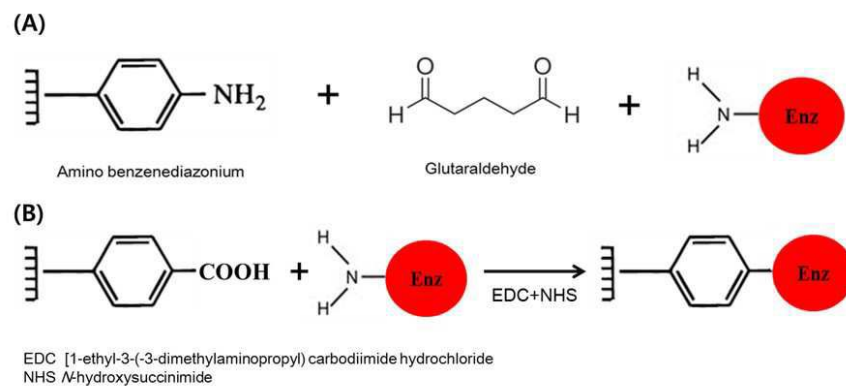
도면2



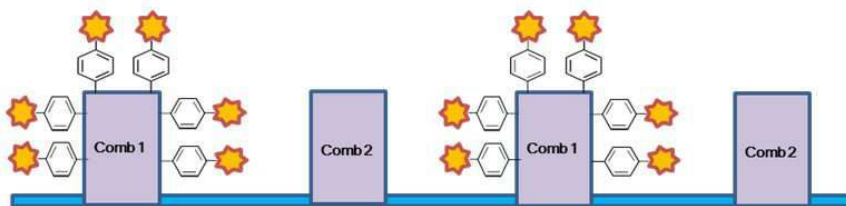
도면3



도면4

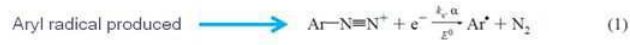


도면5

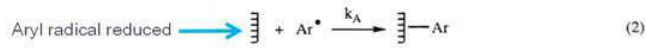


도면6

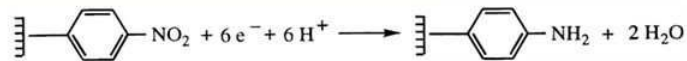
Step 1: Reduction of diazonium salt on electrode surface.



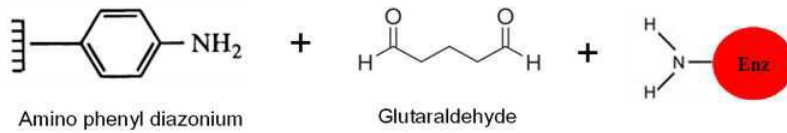
E^0 , k_e , and α are the standard potential, standard rate constant, and transfer coefficient of the rate-determining electron transfer.



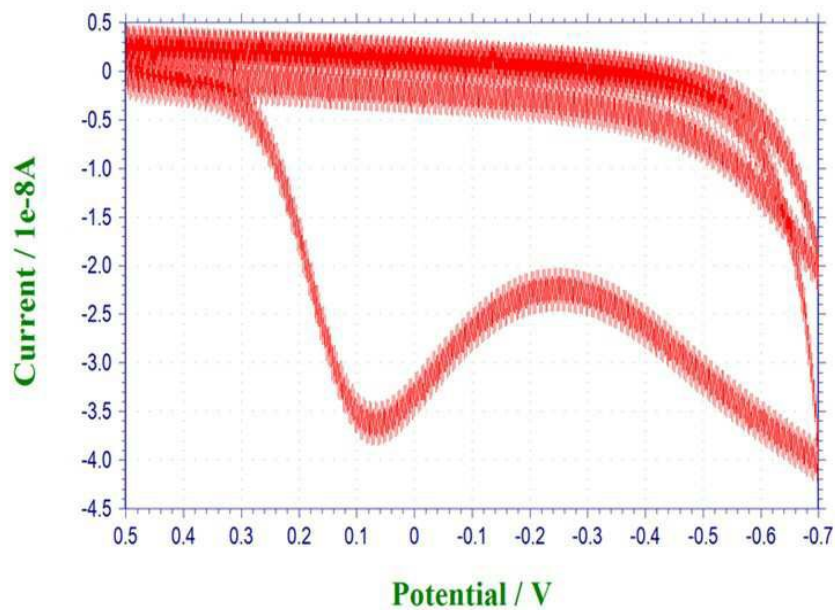
Step 2: Reduction of nitro to amino terminal.



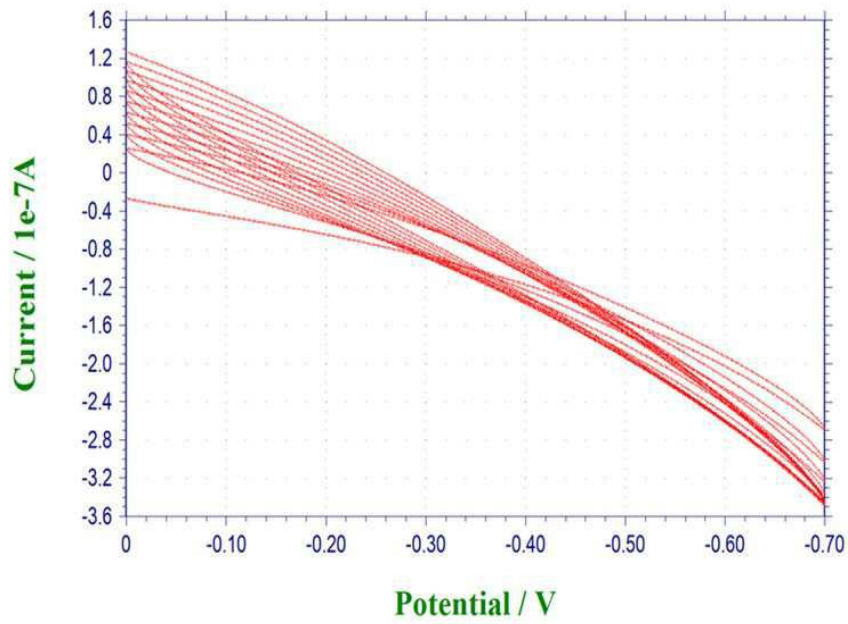
Step 3: Immobilization of enzyme



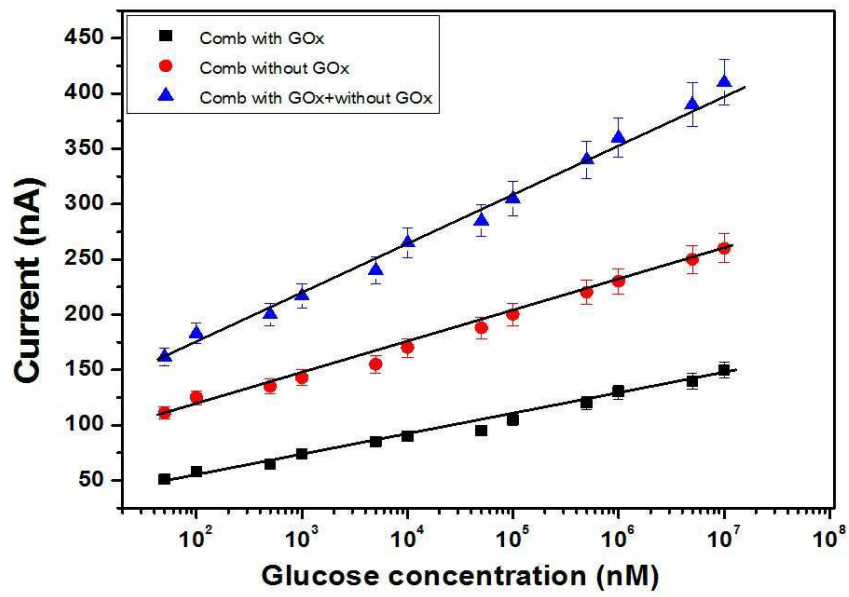
도면7



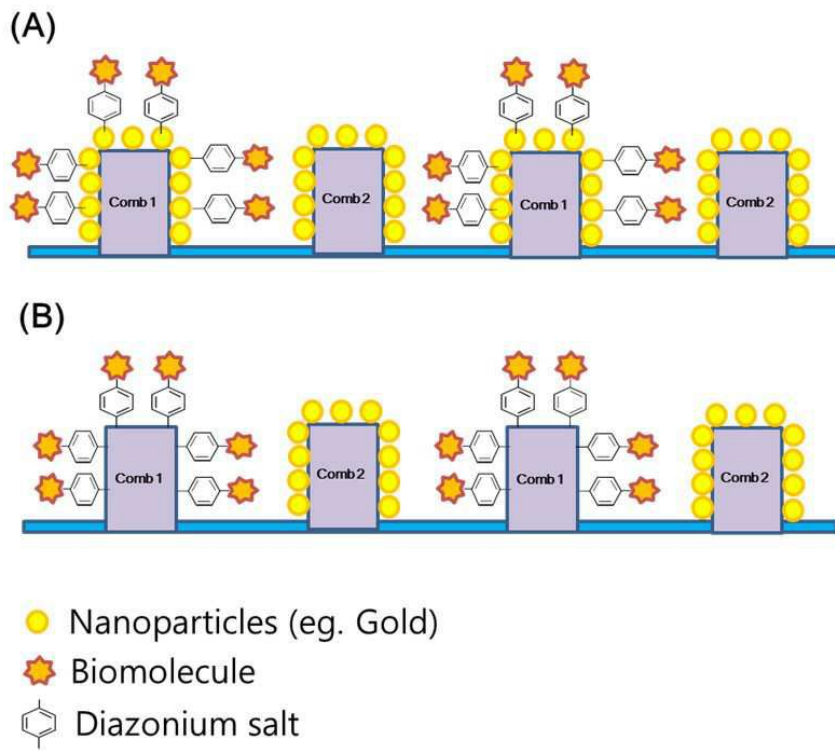
도면8



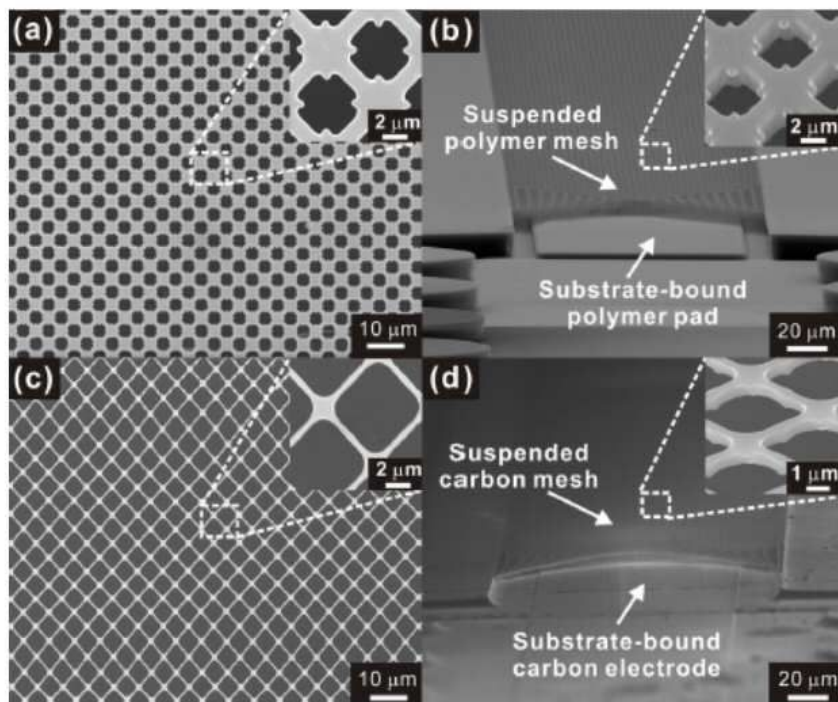
도면9



도면10



도면11



도면12

