



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0094682
(43) 공개일자 2019년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/333 (2006.01) C25D 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/333 (2013.01)
C25D 9/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0014127
(22) 출원일자 2018년02월05일
심사청구일자 2018년02월05일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
김규원
인천광역시 연수구 청능대로 124, 연수타운
서예지
인천광역시 연수구 원인제로 212 승기마을아파트
111동 902호
마니반란
인천광역시 연수구 아카데미로 119 게스트하우스
404호
(74) 대리인
차준용

전체 청구항 수 : 총 11 항

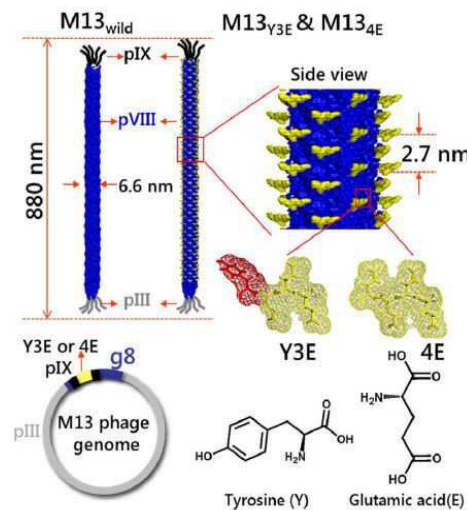
(54) 발명의 명칭 바이러스와의 공침을 통한 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 바이러스와의 공침을 통한 아질산 이온 검출용 금 나노 전극의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 M13 바이러스(야생형 및 M13-Y3E 또는 M13-4E 형태로 설계된 것)와 금(Au)을 전착을 통해 전극(ITO)에 공침(Co-deposition)시킴으로써, 아질산 이온 검출 및 측정에 대한 우수한 전기 화학적 반응을 나타내는 금 나노 구조를 간단한 방법으로 제조할 수 있는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따라 제조된 나노 전극은 많은 간섭물질의 존재 하에서도 아질산 이온에만 선택적으로 감응하는 것을 확인할 수 있었으며, 전극이 100 μ M 수준의 낮은 농도의 아질산 이온을 선택적으로 검출할 수 있다는 것을 밝혀 낼 수 있었다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

금(Au)과 M13 바이러스(M13 virus)를 전극 표면에 전기화학적으로 공침(Electrochemical co-deposition)시켜 금 나노 구조(Au NSs)를 형성하는 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 공침은 전착(Electrodeposition)에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 전착(Electrodeposition)은 금 전구체, M13 바이러스(M13 virus) 및 황산(H_2SO_4)을 함유하는 전해액에서 수행되는 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 금 전구체는 $HAuCl_4$ 또는 $AuCl_3$ 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 M13 바이러스는 티로신/글루탐산/글루탐산/글루탐산으로 이루어진 서열(YEEE)의 펩타이드 또는 글루탐산/글루탐산/글루탐산/글루탐산으로 이루어진 서열(EEEE)의 펩타이드가 표면에 발현되도록 설계된 M13 바이러스인 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 설계된 M13 바이러스는 M13 바이러스의 주요 피복 단백질(Major coat protein)인 P8 단백질의 표면에 상기 펩타이드가 부착되도록 설계된 것임을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 YEEE 펩타이드가 표면에 발현되는 M13 바이러스(M13-Y3E)는 하기 서열번호 1 및 3으로 표시되는 프라이머

를 사용하여 역전사 PCR(inverse polymerase chain reaction) 클로닝 방법을 통하여 준비되는 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법:

[서열번호 1]

5'-ATATATCTGCAGNKTAYGAAGAGGAANNKGATCCCGCAAAGCGGCCTTTAACTCCC-3' '

[서열번호 3]

5'-GGAAGCTGCAGCGAAAGACAGCATCGGAACGAGG-3' '.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 EEEE 펩타이드가 표면에 발현되는 M13 바이러스(M13-4E)는 하기 서열번호 2 및 3으로 표시되는 프라이머를 사용하여 역전사 PCR(inverse polymerase chain reaction) 클로닝 방법을 통하여 준비되는 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법:

[서열번호 2]

5'-ATATATCTGCAGNKGAAAGAGGAAGAGCCCGCAAAGCGGCCTTTAACTCCC-3'

[서열번호 3]

5'-GGAAGCTGCAGCGAAAGACAGCATCGGAACGAGG-3' '

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 전극은 ITO(Indium tin oxide) 전극인 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 M13 바이러스의 농도는 0.001 ~ 0.1 mg/ml인 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 공침(Electrochemical co-deposition) 시간은 5 ~ 500초인 것을 특징으로 하는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 바이러스와의 공침을 통한 아질산 이온 검출용 금 나노 전극의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 M13 바이러스(야생형 및 M13-Y3E 또는 M13-4E 형태로 설계된 것)와 금(Au)을 전착을 통해 전극(ITO)에 공침(Co-deposition) 시킴으로써, 아질산 이온 검출 및 측정에 대한 우수한 전기 화학적 반응을 나타내는 금 나노 구조를 간단한 방법으로 제조할 수 있는 아질산 이온 검출용 금 나노전극의 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0003] 아질산 이온(NO_2^-)은 식품 첨가제, 부식 억제제 및 비료에서 주로 발생하는 환경 및 인체에 해로운 무기 오염물질 중 하나이다. 이 중 비료는 물(바다, 땅, 호수, 강, 빗물)을 오염시키는 주요 아질산 이온 공급원이며 높은 농도의 아질산 이온은 아민과 상호작용하여 발암물질인 N-나이트로스아민을 형성시켜 인체와 동물의 건강에 많은 위험을 초래한다. 이러한 이유로 세계 보건기구(WHO)에서는 음용수의 아질산 이온 최대 허용치를 3 mg/L로 제한하고 있다. 따라서, 건강 및 환경을 위해 아질산 이온의 농도를 정확하게 검출하는 것이 매우 중요하다. 아질산 이온의 정확한 농도를 검출하기 위해서 전기 화학뿐 아니라 분광 광도법, 화학 발광, 모세관 전기영동, 크로마토그래피 등을 이용한 다양한 검출 방법들이 연구되어 왔다. 그러나 이러한 분석 방법은 일반적으로 값 비싼 장비를 필요로 하고 시간이 많이 소요된다는 단점을 지니고 있다. 그에 비해 전기 화학을 기반으로 한 검출 방법은 간단하고, 상대적으로 저렴하고, 높은 신뢰성과 민감성을 지녀 실시간으로 분석할 수 있다는 이점이 있다. 따라서, 높은 감도를 지닌 전기화학 기반의 센서를 제조하기 위해서는 아질산 이온의 산화를 위한 잠재적인 전극 물질을 개발하는 것이 매우 중요하다. 전극의 작동 전위를 낮추고 감도 및 분석 물질에 대한 선택성을 높이기 위해서 전극 표면은 일반적으로 다양한 금속 및 금속 산화물 나노 구조체, 생물학적 분자 등으로 변형된다. 특히, 금(Au)을 기반으로 한 전기 촉매는 전자 전달을 촉진할 수 있으므로 전기 화학반응의 속도를 증가시키는 촉매로 사용될 수 있기 때문에 아질산 이온 검출 및 측정에 대한 우수한 전기 화학반응을 나타내었다.

[0004] 최근 몇 년 동안, 펩타이드(peptide) 디스플레이(display) 기술은 금속 및 금속산화물 나노 구조체 표면을 인식하기 위한 펩타이드(peptide) 스크리닝(screening) 지휘 도구로 개발되었다. 따라서, 생물학적 분자(DNA, 펩타이드(peptide), 단백질 및 바이러스)들은 생체 광물화(biomineralization)로 알려진 놀라운 수준의 조절로 나노 구조체를 성장시키고 조립하는 독특한 능력들이 개발되었다. 이러한 생물학적 분자는 분자적으로 정밀한 모양과 나노 구조체들과 통신하는 공간을 구성시킬 뿐 아니라 전기적 및 광학적 특성을 갖는 기능적인 어셈블리들을 구축하기 위해 표면에 결합하거나 핵 형성, 나노 구조체들의 조립 등의 특징을 지니기 때문에 템플릿으로 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 근거를 바탕으로 용액 상태에서의 나노 구조체들의 어셈블리와 생물학적 분자를 기반으로 한 인식 시스템을 사용하여 직접적으로 기관에 나노 구조체들을 고정시킨 연구가 보고된 바 있다. 특히, M13 바이러스는 다양한 나노 구조체에 선택적으로 결합하는 생물학적 분자 물질로 많이 사용되어왔다.

[0005] M13 바이러스는 *Escherichia coli*(*E.coli*, 대장균)에 특이적으로 결합하는 가는 실 형태의 바이러스다. M13 바이러스는 대부분의 바이러스와 같이 자신의 유전 물질을 숙주(*E.coli*, 대장균)에 주입하여 복제한다. 이는 원형의 단일 가닥 DNA를 가진 길이 880 nm, 너비 6.5 nm의 가는 실 형태로 DNA는 p3, p6, p7, p8, p9이라 불리는 5개의 외피 단백질(capsid protein)로 둘러싸여 있다. 주요 외피 단백질인 p8 단백질은 2700개의 사본으로 구성되어 있으며 M13바이러스의 몸통을 둘러싸고 있고 그 외 p3, p6, p9 및 p7 단백질은 5-7개의 사본으로 구성되어 양 끝 말단에 위치하여 있다.(그림 1) 5개의 외피 단백질 모두 M13 바이러스의 구조 안정성에 기여하지만 그 중 p3 외피 단백질은 대장균 인식과 감염에 필수적인 요소로 작용한다.

[0006] 최근, M13 바이러스는 다양한 금속 및 금속 산화물 나노 구조체를 제작하기 위한 유망한 바이오 표본으로 밝혀졌으며 센서, 에너지 및 생체 의학 응용 분야의 전극 재료로 많이 사용되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Won et al., 2013, "Quantum dot-engineered M13 virus layer-by-layer composite films for highly selective and sensitive turn-on TNT sensors." Chemical Communications, 49(54), pp.6045-6047.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 종래의 요구를 충족시키기 위한 것으로, 바이러스와의 공침을 통한 금 나노 전극 및 이

를 통해 제조된 Pt 나노 구조 촉매의 용도를 제공하는 것을 기술적 과제로 한다.

[0009] 구체적으로, 본 발명자들은 표면 활성 물질을 사용하지 않고 오직 4E type 바이러스와 금 전구체 혼합물만을 사용하여 전기화학적 공 증착(electrochemical co-deposition) 방식을 통해 전극 표면에 흡착시켜 M13 바이러스를 기반으로 한 수상 돌기 모양의 나노 구조체(Dendritic nanostructure)를 형성시켰다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 아질산 이온 검출 센서를 제작하기 위해 wild type, Y3E type, 4E type 이렇게 세 가지 type의 M13 바이러스와 금 전구체 혼합물을 전해질로 사용하여 인듐-틴 산화물(ITO) 전극 표면에 전기화학적으로 증착시키는 과정을 통해 인듐-틴 산화물(ITO) 전극 표면에 파아지가 혼입된 금 나노 복합체를 고정하였다. 이렇게 준비된 파아지가 혼입된 금속 나노 복합체가 수식된 전극 표면 형태에 대한 정보는 주사전자현미경(SEM), X-선 회절 분석법(XRD), 에너지 분산 X-선 분광법(EDX)을 통해 확인하였으며 각 전극의 전기화학적 촉매 활성은 순환전압 전류법(CV), 선형주사전위법(LSV) 등의 전기화학 기법들을 이용하여 알아보았다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따라 제조된 바이러스-공침 금 나노 구조는 아질산 이온 산화에 대해 다른 전극들에 비해 가장 큰 전류값을 가지는 것을 확인할 수 있었고 아질산 이온 검출에 대해 최적화된 ITO 전극을 개발하였다.

[0013] 또한 많은 간섭물질의 존재 하에서도 아질산 이온에만 선택적으로 감응하는 것을 확인할 수 있었으며, 전극이 100 μ M 수준의 낮은 농도의 아질산 이온을 선택적으로 검출할 수 있다는 것을 밝혀낼 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 Wild type, Y3E type, 4E type M13 바이러스의 단면도이다.

도 2는 ITO/Au(A, A1), ITO/Au_{wild}(B, B1), ITO/Au_{Y3E}(C, C1), ITO/Au_{4E}(D, D1) 전극의 FE-SEM 이미지를 나타낸 사진이다.

도 3은 ITO/Au_{4E} 전극의 FE-SEM 이미지(A-D)와 (E) mapping, (F) EDX 분석결과를 나타낸 사진이다.

도 4는 (a) ITO/Au, (b) ITO/Au_{wild}, (c) ITO/Au_{Y3E}, (d) ITO/Au_{4E} 전극의 XRD 분석 결과를 나타낸 사진이다.

도 5는 시간에 따른 ITO/Au_{4E} 전극의 FE-SEM 이미지를 나타낸 사진이다; A: 5초, B: 10초, C: 20초, D: 50초, E: 100초, F: 500초.

도 6은 농도에 따른 농도에 따른 ITO/Au_{4E} 전극의 FE-SEM 이미지를 나타낸 사진이다; A: 0.001 mg/mL, B: 0.005 mg/mL, C: 0.01 mg/mL, D: 0.05 mg/mL, E: 0.1 mg/mL.

도 7A는 (a) ITO/Au, (b) ITO/Au_{wild}, (c) ITO/Au_{Y3E}, (d) ITO/Au_{4E} 전극에서 0.1 M PBS(pH 7.2)를 전해질로 한 순환전압전류 곡선이다.

도 7B는 (a) ITO/Au, (b) ITO/Au_{wild}, (c) ITO/Au_{Y3E}, (d) ITO/Au_{4E} 전극에서 0.1 M PBS(pH 7.2)를 전해질로 하여 1 mM 아질산 이온이 존재할 때의 순환전압전류 곡선이다.

도 7C는 서로 다른 농도의 4E type M13 바이러스로 제작한 ITO/Au_{4E} 전극에서 0.1 M PBS(pH 7.2)를 전해질로 한 1 mM 아질산 이온의 질량 표준화된 순환전압전류 곡선이다; a: No phage, b: 0.001 mg/ml, c: 0.005mg/ml, d: 0.01 mg/ml, e: 0.05 mg/ml.

도 7D는 0.005 mg/ml의 4E type M13 바이러스로 제작한 ITO/Au_{4E} 전극에서 (a) 아질산 이온이 존재하지 않을 때와 (b) 1 mM 아질산 이온이 존재할 때의 순환전압전류 곡선이다.

도 8은 시간에 따른 ITO/Au_{4E} 전극에서 0.5 M H₂SO₄를 전해질로 한 순환전압전류 곡선이다(a: 5초, b: 10초, c: 20초, d: 50초, e: 100초, f: 500초).

도 9A 및 9B는 ITO/Au-4E Pep. 전극(A, A1) 및 ITO/Au_{4E} 전극(B, B1)의 FE-SEM 이미지를 나타낸다.

도 9C는 ITO/Au-4E Pep. 전극(a) 및 ITO/Au_{4E} 전극(b)에서 0.5 M H₂SO₄를 전해질로 한 순환전압전류 곡선이다.

도 9D는 ITO/Au-4E Pep. 전극(a) 및 ITO/Au_{4E} 전극(b)에서 0.1 M PBS(pH 7.2)를 전해질로 한 1 mM 아질산 이온의 질량 표준화된 순환전압전류 곡선이다.

도 10은 (A) ITO/Au_{4E} 전극에서의 넓은 농도범위의 아질산 이온 농도에 따른 선형주사전위 곡선; a: 0, b: 100, c: 200, d: 300, e: 400, f: 500, g: 600, h: 700, i: 800 μ M 아질산 이온, (B) (A)결과에서의 아질산 이온 산화 전류에 대한표준곡선을 나타낸다.

도 11은 ITO/Au_{4E} 전극에서 간섭물질로 (A)양이온(Ca²⁺, Na⁺, K⁺), (B) 음이온(SO₄²⁻, NO₃⁻, CO₃²⁻), (C) 생체 분자(아스코르빅산, 포도당)를 첨가하였을 때의 선형주사전위곡선; a: 0.1 M PBS, b: 4000 μ M의 간섭물질만 존재, c: 간섭물질과 100 μ M의 아질산 이온이 존재, (D) 각 간섭물질의 전류비에 대한 도표를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0016] 실시예

[0017] (1) 시약 및 장비

[0018] Sigma-Aldrich로부터 금(III) 클로라이드 수화물(HAuCl₄·3H₂O), L-아스코르빈산(AA), 아질산나트륨 및 D-(+)-포도당을 구매하였다. 네이티브 4E 펩타이드 (4E Pep)를 Anygen으로부터 받았다. 모든 화학 물질은 분석 등급이었으며 수령한 대로 사용되었다. FESEM 이미지는 JEOL JSM-7800F 장비로 기록되었다. XRD 프로파일은 Smart Lab (Rigaku) 장비를 사용하여 기록했다. 인듐 주석 산화물 (ITO, (dimension; 2 x 1 cm)) 및 그 변형 된 형태가 작용 전극으로 사용되었다. Pt 와이어를 상대 전극(counter electrode)으로 사용하고 Ag/AgCl(3M NaCl 용액 중)을 기준 전극(reference electrode)으로 사용하였다. 모든 전기 화학 실험은 Ivium Technologies 전기 화학 워크 스테이션을 사용하여 단일 구획 3 전극 셀에서 수행되었다. 질소(N₂)를 각 실험 전에 30분 동안 버블링시켰다.

[0020] (2) Wild-type M13 (M13_{wild}) 준비

[0021] "Korkmaz N., Recombinant bacteriophages as gold binding bio-templates, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 112 (2013) 219-228."에 기술된 표준 생화학 프로토콜에 따라 M13_{wild}을 성장 및 정제하였다.

[0022] 즉, E. coli XL-1 블루의 단일 콜로니를 3mL LB 배지에서 mid-log phase까지 성장시키고(E. coli XL-1 blue culture), 10 μ L M13_{wild}으로 감염시켰다. 배양물을 37°C에서 12시간 동안 진탕 배양한 후, 원심 분리하여 E. coli를 제거하였다. PEG/NaCl(20% PEG 및 2.5mol/L NaCl) 침전에 의해 M13_{wild}을 수집하고, TBS(Tris-buffered saline, 10 mM)에서 원상태로 만들었다. 전형적으로 리터 당 20 mg M13_{wild}이 얻어졌다. 최종 농도는 269nm에서 흡광계수 3.84 cm²/mg을 사용하여 분광광도계로 측정하였다.

[0024] (3) Y3E 및 4E 펩타이드(peptide)로 엔지니어링 된 M13 바이러스 준비

[0025] Y3E 및 4E 펩타이드(peptide)를 wild type 바이러스의 주요 외피 단백질(p8)에 발현시킬 수 있도록 M13 바이러스의 주요 외피 단백질의 유전자(gene 8)에 발현하고자 하는 peptide를 삽입하기 위한 3개의 프라이머(primer)를 설계하였다.

[0026] 5'-ATATATCTGCAGNKTAYGAAGAGGAANNKGATCCCGCAAAAGCGCCTTAACTCCC-3' ' (Y3E),

- [0027] 5'-ATATATCTGCAGNKAAGAGGAAGAGCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCC-3' (4E), 및
- [0028] 5'-GGAAGCTGCAGCGAAAGACAGCATCGGAACGAGG-3' (선형화 프라이머).
- [0029] M13_{Y3E} 및 M13_{4E} 파아지를 수득하기 위하여, 상기 프라이머(선형화 프라이머와 Y3E 및 4E 프라이머)를 이용하여 인버스 PCR(Inverse polymerase chain reaction) 클로닝 방법을 수행하였다.
- [0030] PCR 산물을 정제한 후, 증폭된 플라스미드 및 파지 플라크를 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였고, 증폭된 M13_{Y3E} 및 M13_{4E} 파아지를 실험에 사용하였다. 도 1은 본 발명에서 사용된 M13 파아지의 구조적 특징을 보여준다.

[0032] **(4) 개질된 전극의 제작**

[0033] ITO 전극을 전해액(0.5 M H₂SO₄ 내, 3 mM HAuCl₄·3H₂O + 0.005 mg/mL의 M13_{wild} 또는 M13_{Y3E} 또는 M13_{4E} 또는 4E 펩타이드의 혼합물)에 침지하고, -0.2 V(Ag/AgCl)의 포텐셜을 500초 동안 인가하여 Au 나노 구조(Au NSs)를 전착(electrodeposited)시켰다. 위의 방법으로 제조한 전극은 각각 ITO/Au, ITO/Au_{wild}, ITO/Au_{Y3E}, ITO/Au_{4E}, ITO/Au-4E Pep. 전극이라 명명하였다. 전하(Q)는 0에서 500 초까지 적분되었으며, 하기 식(1)을 사용하여 Au의 비질량(M)을 추정하는데 사용되었다.

[0034]
$$M = Q \times MW / (n \times F) \quad (1)$$

[0035] (상기 식에서, M = 전착 후 비질량, Q = 전착에 소요된 전하량, MW = Au의 분자량, n = 전착을 위해 전달된 전자의 수, F = 패러데이 상수, A = 전극("O" 링)의 기하학적 면적(0.44 cm²).

[0036] 위의 식(1)을 통해 얻은 금의 질량은 전류 밀도 곡선을 얻기 위해 전류를 정규화하는데 사용하였다. 다음으로, 전기화학적 활성 표면적(ECSA)은 아래의 식(2)을 통해 제조된 전극에서 금 산화물 단일 층(monolayer)을 형성하기 위해 소모된 전하로부터 얻을 수 있었으며 이는 전류 밀도 곡선을 얻기 위해 사용되었다.

[0037]
$$ECSA = Q / Q^* \quad (2)$$

[0038] (상기 식에서, Q = 금 나노 구조체 표면에서 금 산화물 단일 층을 형성하는데 필요한 전하, Q* = 390 μC cm⁻²의 값을 갖는 고정된 인자)

[0040] **(5) 전기화학적 실험**

[0041] 제조한 전극에서의 아질산 이온의 전기촉매 작용, 감지 및 선택성 연구는 순환전압전류법(CV) 및 선형주사전위법(LSV)을 통하여 수행하였다. 순환전압전류법(CV)을 위해 0.1 M PBS (pH 7.2) 용액에 1 mM 아질산나트륨(NaNO₂)을 첨가하였으며, 선형주사전위법(LSV)을 통한 감지를 위하여 100 μM의 아질산나트륨을 첨가하였다.

[0042] 이후 아질산 이온에 대한 선택성 실험은 아질산 이온 농도에 비해 40배 높은 농도의 금속 양이온 또는 음이온, 생체 분자를 첨가하여 선형주사전위법을 이용하여 진행하였다. 모든 전기화학 실험은 기준전극으로는 Ag/AgCl 전극을 사용하였으며 상대전극은 백금(Pt wire) 전극을 사용하였다. 또한 순환전압전류법(CV)과 선형주사전위법(LSV)에서 주사한 전위의 범위는 0 ~ 1.2V로 동일하였으며 상온(25 °C)에서 수행하였다.

[0044] **실험예: 개질된 전극의 특성 평가**

[0045] **(1) 개질된 전극의 표면 특성화**

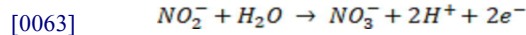
[0046] 도 2는 본 발명을 통하여 제작한 파아지가 혼입된 금속 나노 복합체로 개질된 ITO 전극 표면의 주사 전자 현미경(SEM) 사진이다. 도 2A 및 2A1에서 알 수 있듯이 M13 바이러스가 존재하지 않는 ITO/Au 전극에서의 금 나노 복합체의 형태는 꽃 모양을 나타내었다. 반면에 M13 바이러스가 존재하는 ITO/Au_{wild}, ITO/Au_{Y3E}, ITO/Au_{4E} 전극에서 관찰된 금속 나노 복합체의 형태는 ITO/Au 전극에 수식된 금속 나노 복합체와는 다른 형태의 금속 나노 복합체가 형성된 것을 관찰할 수 있었다(도 2. B,C,D).

- [0047] 각 전극을 고배율의 주사 전자 현미경(FE-SEM)으로 관찰한 결과에서는 ITO/Au 전극과 ITO/Au_{W1d}, ITO/Au_{V3E} 전극에서는 구성하고 있는 금속 나노 복합체의 모양이 꽃 또는 팜콘 모양과 같은 것을 관찰할 수 있었으며, 결정학적 방향을 따라 어떠한 특이적인 성장을 보이지 않는다는 것을 확인할 수 있었다(도 2. A1, B1, C1).
- [0048] 반면에 4E type M13 바이러스로 제작한 ITO/Au_{4E} 표면에서는 덴드라이트(dendrite) 모양 즉, 수상 돌기 모양의 금속 나노 복합체가 형성된 것을 확인할 수 있었다(도 2. D1). 이러한 결과로 4E type M13 바이러스와 이에 발현된 4E 펩타이드(peptide)가 금속 나노 복합체의 모양을 제어하는데 많은 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.
- [0049] 도 3은 ITO/Au_{4E} 전극 표면의 FE-SEM 이미지와 mapping, EDX 분석 결과를 보여준다. 이 결과로 ITO/Au_{4E} 전극 표면에 존재하는 금속 나노 복합체의 형태가 수상 돌기 형태라는 것을 확인할 수 있으며, mapping과 EDX 분석 결과를 통해 수상 돌기 형태의 금속 나노 복합체가 금으로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다.
- [0050] 또한 XRD 분석을 통해서도 전극 표면에 수식된 금속 나노 복합체의 결정 구조를 확인할 수 있었다(도 4). XRD 분석 결과, 제작한 4개의 전극 모두에서 38.3°, 44.4°, 64.8° 및 77.6° 에 회절 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 금의 밀러지수인 (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) 및 (3 1 1)에 상응하여 제작한 전극 표면에 면심입방구조(fcc)의 금 나노 구조체가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다(JCPDS card number 4-0784).
- [0052] ITO/Au_{4E} 전극 표면에 존재하는 수상 돌기 형태의 금 나노 복합체의 형성에 대한 메커니즘은 다음과 같이 제시할 수 있다. 첫 번째로, 금 전구체인 AuCl₄⁻가 4E type M13 바이러스 표면에 발현된 4E 펩타이드(peptide)에 존재하는 글루탐산(glutamic acid, E)의 아민(-NH₂) 그룹에 부착하여 아민 클로라이드(amine chloride)복합체를 형성한다. 그 다음, -0.2V의 일정 전위를 주사하게 되면 AuCl₄⁻는 부착 위치로부터 서서히 방출되고 Au⁰로 환원된다. 이 때 Au⁰는 안정화 되기 위해 응집되어 Au⁰핵을 형성하는 경향이 있으며 이 때 4E type M13 바이러스가 호스팅 될 것으로 예상된다. 이는 핵이 생성된 Au⁰는 Au 원자 클러스터를 형성하고 동시에 4E 펩타이드(peptide)의 -COOH가 ITO 표면에 부착되어 수상 돌기 형태의 나노 복합체의 성장 중심이 될 것이라 생각되기 때문이다. 이러한 4E type M13 바이러스에 부착된 금 원자 클러스터는 수상 돌기 형태의 나노 복합체 성장을 이끄는 seed 역할과 추가적인 환원제로 사용될 것이다. 마지막으로, 위에 언급한 아민 클로라이드 복합체로부터 Au³⁺의 느린 방출은 비평형화 반응의 환원 속도 감소에 대한 중요한 요소로 이로 인해 ITO/Au_{4E} 전극 표면에 수식된 금 나노 복합체에서 이방성(anisotropic) 성장이 발생하게 된 것이다.
- [0054] (2) 증착 시간 및 농도의 최적화
- [0055] 4E type M13 바이러스와 금 전구체의 혼합물을 ITO 표면에 전기화학적 공 증착(electrochemical co-deposition) 시간을 5초, 10초, 20초, 50초, 100초, 500초로 하여 ITO/Au_{4E} 전극을 제작하였다.
- [0056] 도 5를 참조하면 공 증착(electrochemical co-deposition) 시간이 20초 일 때엔 수상 돌기 형태의 금 나노 복합체의 2차적 성장이 시작된 것을 확인할 수 있었으며(도 5C) 전기화학적 공 증착(electrochemical co-deposition) 시간이 50초 이상일 때부터는 수상 돌기 형태를 가진 금 나노 복합체가 명확하게 관찰되었다(도 5D, E, F).
- [0057] 도 6을 참조하면 서로 다른 M13 바이러스 농도로 제작된 ITO/Au_{4E} 전극에 수식된 금속 나노 복합체의 형태는 M13 바이러스의 농도가 증가함에 따라 수상 돌기 형태에서 꽃과 같은 형태로 변하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 M13 바이러스의 농도가 증가하면서 금속 나노 복합체의 크기와 모양이 줄어들게 되어 꽃과 같은 형태의 금속 나노 복합체가 형성된 것으로 보인다.
- [0059] (3) 전기화학적 촉매 활성 평가
- [0060] Au-DNs의 효과를 조사하기 위해, pH 7.2에서 NO₂⁻의 부재 및 존재하에서 상이한 개질된 전극에 대한 CV 및 LSV

를 0~1.2V의 전위 범위에서 비교 하였다

[0061] 순환전압전류법(CV)을 통해 금 나노 복합체로 제작된 ITO/Au, ITO/Au_{wild}, ITO/Au_{3E}, ITO/Au_{4E} 전극 모두에서 아질산 이온이 존재하지 않아도 금에 대한 특징적인 산화, 환원 피크(peak)가 생기는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 전극 표면에 결정 구조의 금 나노 복합체가 존재한다는 것을 나타낸다(도 7A).

[0062] 각 전극에서 발생하는 아질산 이온 산화에 대한 반응식은 아래와 같다.



[0065] 또한 각 전극 표면에서의 아질산 이온에 대한 전기화학적 촉매 활성을 pH 7.2의 0.1 M PBS 용액 존재하에 1 mM 아질산 이온을 첨가하여 순환전압전류법(CV)을 통해 알아보았는데, 전극 모두에서 아질산 이온이 존재할 때 0.85V 근처에서 더 큰 전류 피크(peak)가 관찰되었으며, 이는 제작한 모든 전극에서 아질산 이온의 산화가 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 이 중 ITO/Au_{4E} 전극은 다른 전극과 비교할 때 아질산 이온 산화에 대한 촉매 반응이 가장 큰 것을 확인할 수 있었다(도 7B).

[0067] 다음으로 서로 다른 M13 바이러스 농도로 제작된 ITO/Au_{4E} 전극 표면들의 전기화학적 촉매 활성에 대해 알아보는 실험을 진행하였다.

[0068] 각 전극 표면에서의 전기화학적 촉매 활성은 앞서와같이 각 전극 표면들에서 순환전압전류법(CV)을 이용하여 아질산 이온에 대한 전기화학적 산화반응을 통해 알아보았다. 이 때, 0.005 mg/ml의 농도를 가지는 4E type M13 바이러스로 제작한 ITO/Au_{4E} 전극 표면에서 0.85V 부근에서 가장 높은 아질산 이온 산화에 대한 전류 값을 가지는 것을 확인할 수 있었다(도 7C). 이러한 결과로 아질산 이온 검출 센서로 사용하기 위한 ITO/Au_{4E} 전극을 제작할 때 가장 좋은 전기화학적 촉매 활성을 지니는 M13 바이러스의 농도는 0.005 mg/ml 이라는 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 도 7D에서는 순환전압전류법(CV)을 통해 ITO/Au_{4E} 전극 표면에서의 아질산 이온 산화반응에 대해 관찰한 결과로 아질산 이온이 존재할 때 그렇지 않을 때보다 더 높은 전류 값을 가지는 것을 보여 ITO/Au_{4E} 전극 표면에서 아질산 이온 산화 반응이 일어난다는 것을 확인할 수 있었다.

[0071] 다음으로 서로 다른 공 증착 시간으로 제작된 ITO/Au_{4E} 전극 표면들의 전기화학적 촉매 활성에 대해 알아보는 실험을 진행하였다.

[0072] 전극 표면에 존재하는 금 나노 복합체의 전기화학적으로 활성화된 표면적(Electrochemically active surface area, ECSA)에 대한 정보는 0.5 M H₂SO₄를 전해질로 하여 순환전압전류법(CV)을 통해 전극 표면에 존재하는 금 나노 복합체를 산화, 환원시키는 것으로 알아보았다. 이 때, ITO/Au_{4E} 전극 표면에 존재하는 금 나노 복합체의 산화 및 환원 전류는 전기화학적 공 증착(electrochemical co-deposition) 시간이 500초 일 때 가장 큰 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0073] 이 때 소비된 전하의 양을 이용하여 각 전극에서의 전기화학적으로 활성화된 표면적(ECSA)을 계산해본 결과에서도 전기화학적 공 증착(electrochemical co-deposition) 시간이 500초 일 때 가장 큰 전기화학적으로 활성화된 표면적을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

[0075]

Modified electrodes	Q (μC)	ECSA (cm ⁻²)
ITO/Au	2.06	0.005
ITO/Au _{4E} (5 s)	4.20	0.011

ITO/Au _{4E} (10 s)	3.41	0.009
ITO/Au _{4E} (20 s)	6.77	0.017
ITO/Au _{4E} (50 s)	6.05	0.016
ITO/Au _{4E} (100 s)	10.90	0.028
ITO/Au _{4E} (500 s)	12.50	0.032

[0077] (4) 4E type M13 바이러스와 4E peptide 비교

[0078] M13 바이러스 표면에 발현된 4E 펩타이드(peptide)의 역할을 알아보기 위해 4E 펩타이드(peptide)와 금 전구체 혼합물을 ITO 전극 위에 전기화학적 공 증착(electrochemical co-deposition)을 이용하여 ITO/Au-4E Pep. 전극을 제작하였다.

[0079] 4E 펩타이드(peptide)를 사용하여 제작한 ITO/Au-4E Pep. 전극 표면에서는 4E type M13 바이러스를 사용하여 제작한 ITO/Au_{4E} 전극 표면에서 발견되는 수상 돌기 형태의 금속 나노 복합체를 확인할 수 없었고 꽃 모양의 금속 나노 복합체가 형성되었음을 확인할 수 있었다(도 9A 및 9B). 또한 도 9C 및 9D를 참조하면 전기 화학적 측 때 활성은 ITO/Au_{4E} 전극에서 더 높은 것으로 나타났다. 이는 4E 펩타이드(peptide)만이 수상 돌기 모양의 금속 나노 복합체를 형성하는데 영향을 주는 것이 아니며, 4E 펩타이드(peptide)가 발현된 4E type M13 바이러스의 가는 실 형태의 구조는 ITO/Au_{4E} 전극에서 수상 돌기 형태의 금속 나노 복합체의 성장을 위한 핵 형성 자리로서 시너지 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] (5) 전기화학적 바이오 센서 연구

[0082] 제작한 ITO/Au_{4E} 전극(0.005 mg/mL)을 아질산 이온 검출 센서 전극으로 사용하기 위해 선형주사전위법(LVS)를 사용하여 ITO/Au_{4E} 전극이 넓은 농도의 범위를 가진 아질산 이온을 검출할 수 있는지 알아보았다. ITO/Au_{4E} 전극 위에서 0.1 M PBS 존재하에 아질산 이온을 100 μ M씩 첨가시켜 주며 아질산 이온 산화에 대한 전류를 관찰하였다.

[0083] 도 10을 참조하면 아질산 이온의 농도가 증가함에 따라 아질산 이온 산화 전류가 증가하는 것을 확인할 수 있고 (A), 아질산 이온 산화 전류에 대한 표준곡선에서의 상관계수(R^2)값이 0.995로 매우 높은 민감도를 가지는 것을 확인할 수 있었으며 이 때 민감도는 0.190 μ A/ μ M로 계산되었다(B).

[0085] (6) 바이오 센서 선택성 시험

[0086] 본 연구에서는 0.1 M의 PBS 용액에서 100 μ M의 아질산 이온을 검출하는 데에 있어 많은 간섭물질(양이온, 음이온 및 생체 분자)을 첨가하여 제작한 ITO/Au_{4E} 전극이 아질산 이온만을 선택적으로 검출할 수 있는 지 알아보았다.

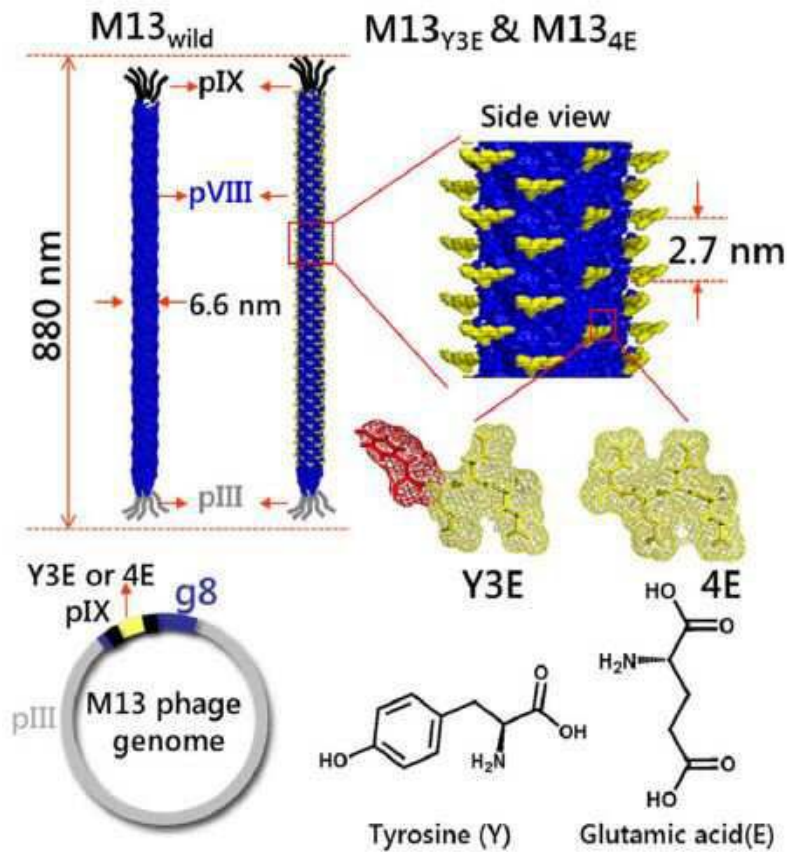
[0087] 간섭물질의 농도는 검출하고자 하는 아질산 이온의 농도에 비해 40배 높은 4000 μ M 로 첨가시켜 주었다. 0.1 M의 PBS 용액에서 100 μ M의 아질산 이온을 검출하는 데 간섭물질로써 양이온으로는 Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , 음이온으로는 SO_4^{2-} , NO_3^- , CO_3^{2-} , 생체 분자로는 아스코르빅산(ascorbic acid) 및 포도당(glucose)을 첨가시켜주었다.

[0088] 0.1 M의 PBS 용액에서 100 μ M의 아질산 이온을 검출하는 데에 있어 NO_3^- 와 포도당이 간섭물질로 존재할 때 이들 산화에 대한 전류가 발생하는 것을 관찰할 수 있다(도 11D). 이는 높은 간섭물질의 농도가 4000 μ M로 매우 높은 농도를 지니기 때문에 이러한 결과가 발생한 것으로 보인다. 또한, 모든 양이온, 모든 음이온을 각각 간섭물질로 첨가하였을 때에도 산화 전류의 값이 발생한 것을 볼 수 있지만(도 11A 및 11B)모든 생체 분자를 간섭물질로 첨가하였을 때에는 이러한 결과를 관찰할 수 없었다.(도 11C)

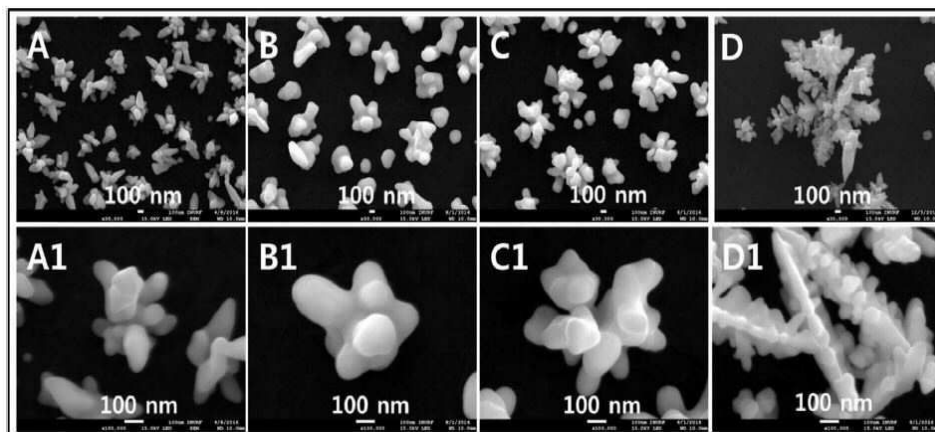
[0089] 이러한 결과들로 본 연구에서 아질산 이온 검출 센서 전극으로써 제작한 ITO ITO/Au_{4E} 전극은 많은 간섭물질에 방해받지 않고 아질산 이온에 높은 선택성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

도면

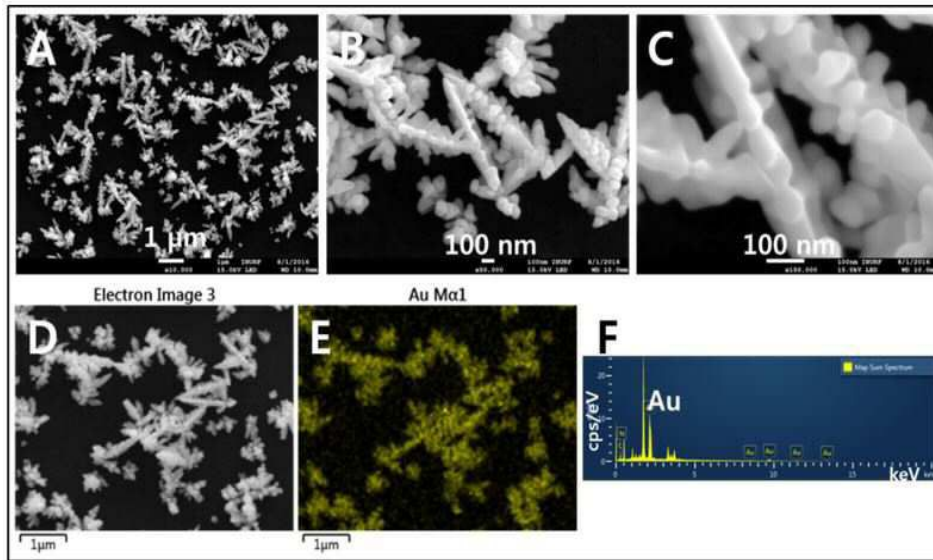
도면1



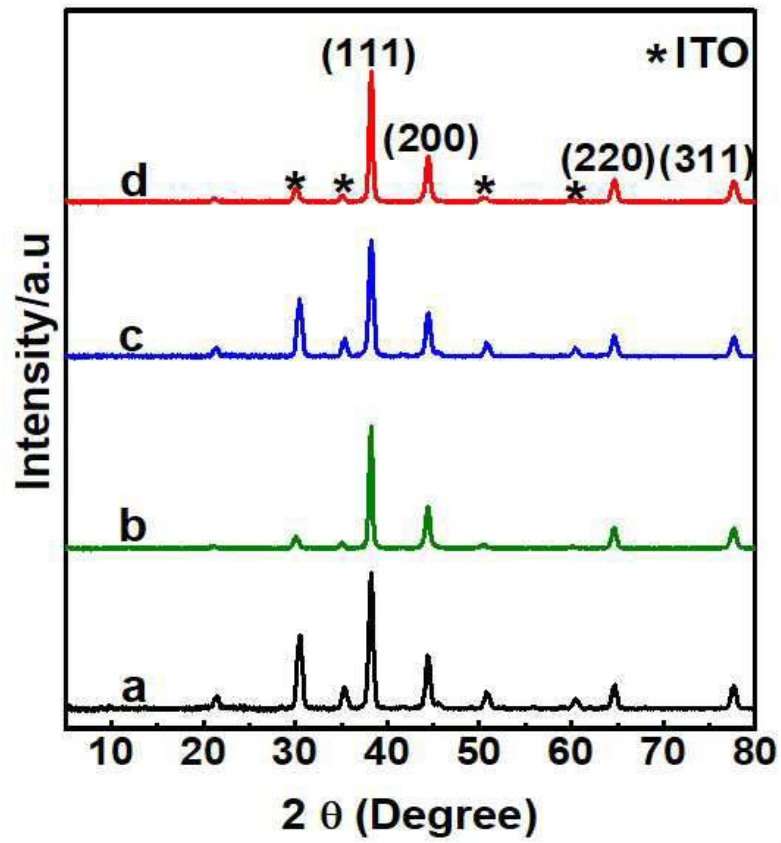
도면2



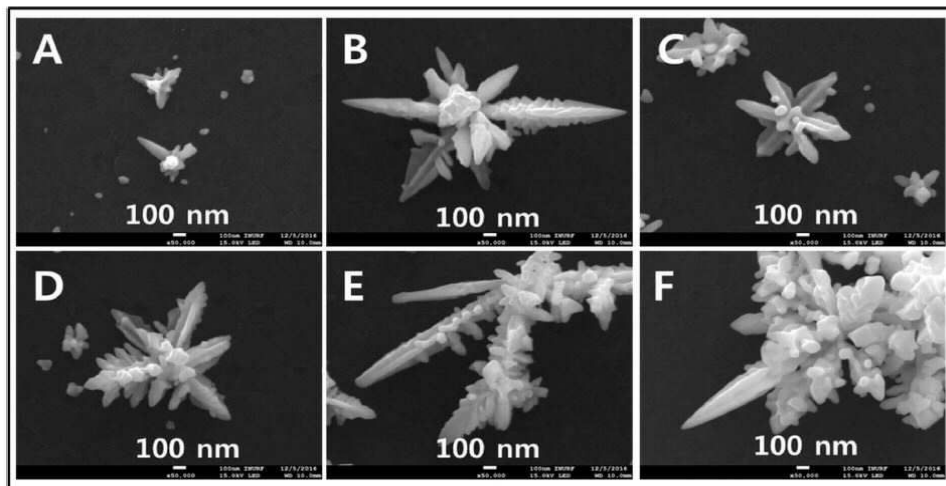
도면3



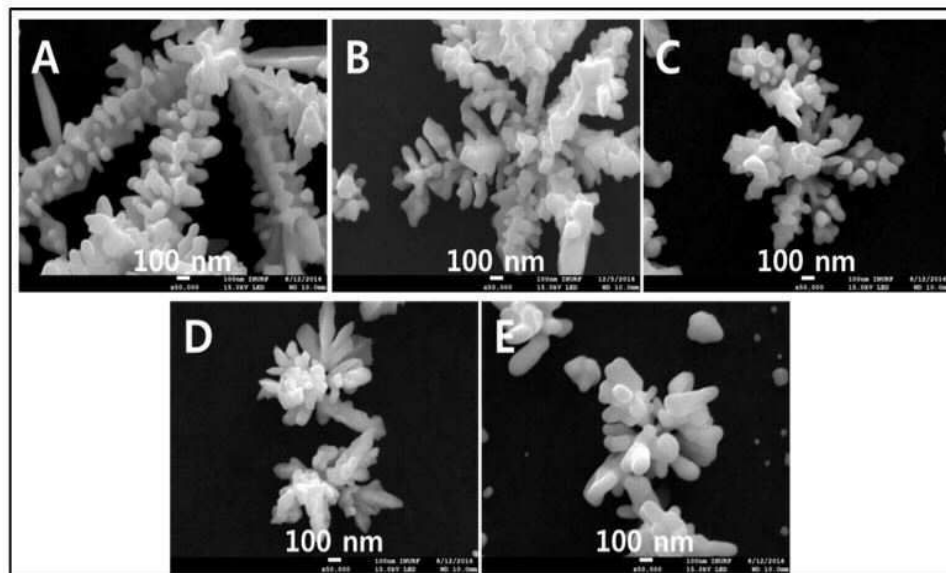
도면4



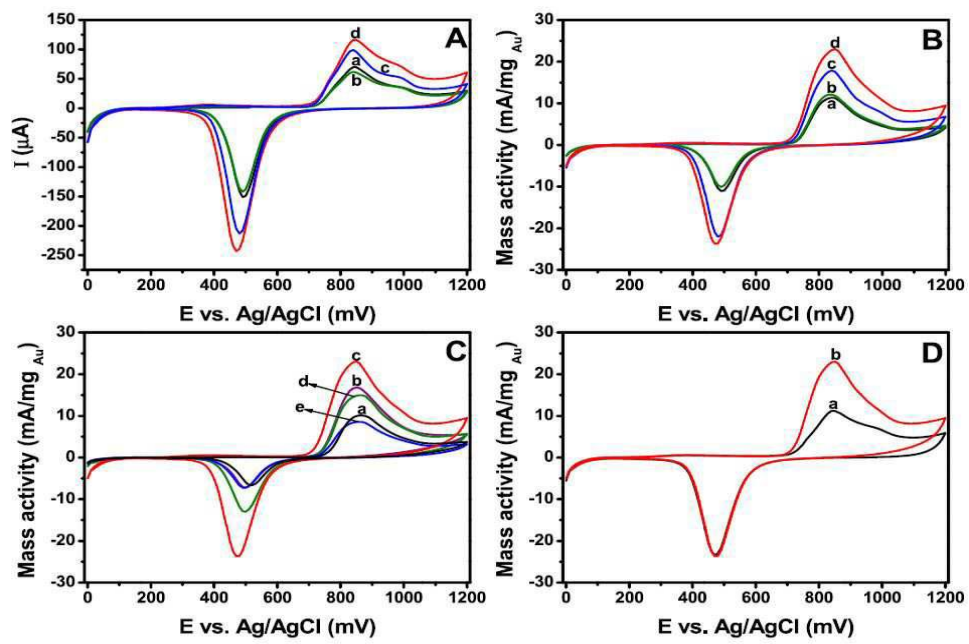
도면5



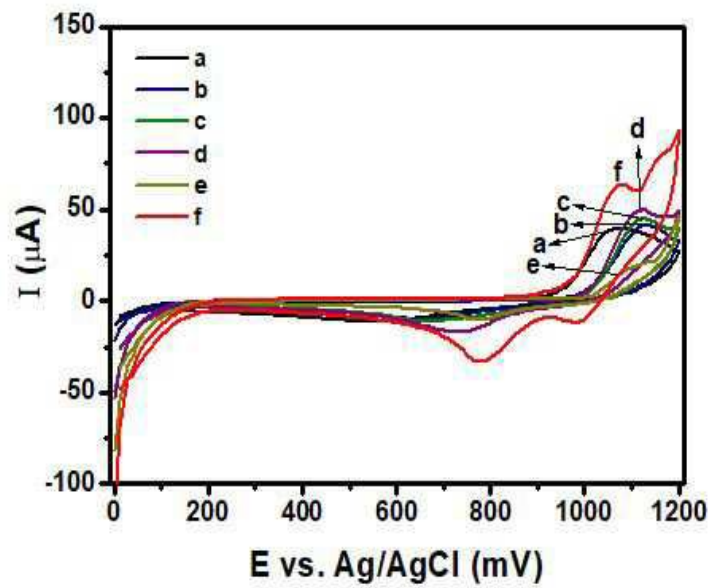
도면6



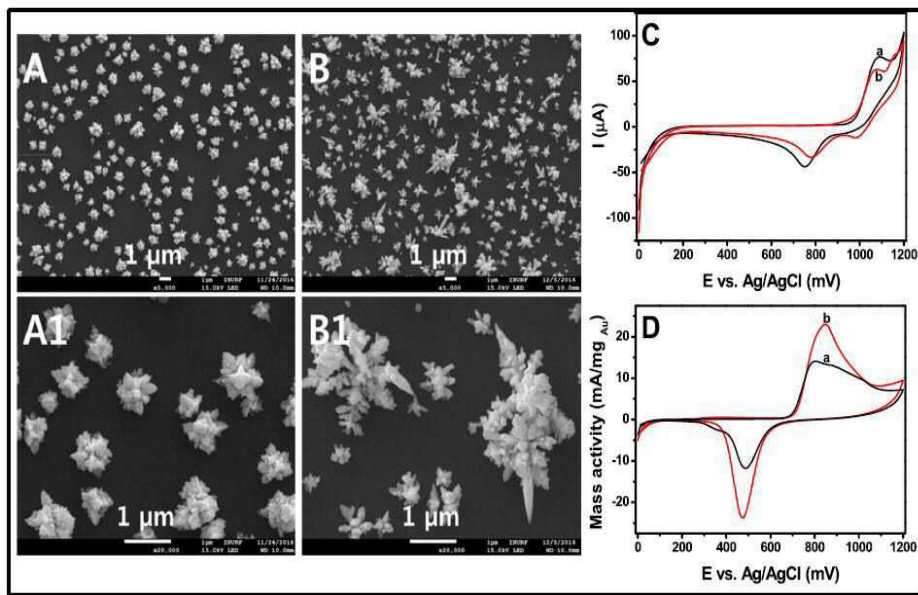
도면7



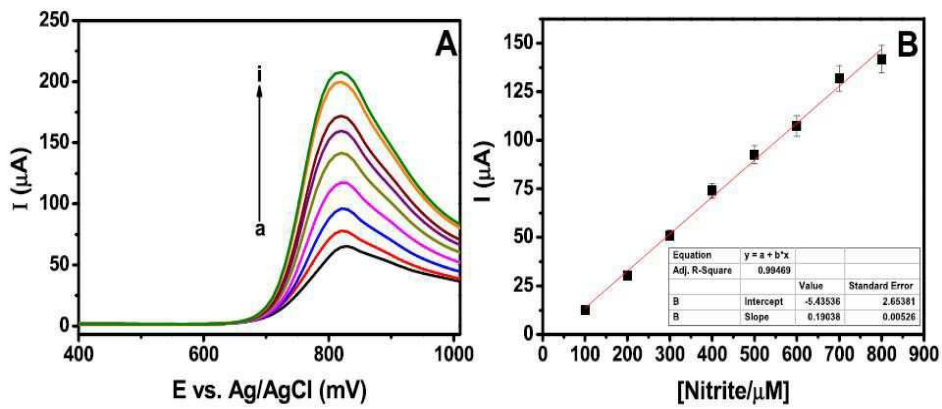
도면8



도면9



도면10



도면11

