



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0097432
(43) 공개일자 2016년08월18일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 33/543</i> (2006.01) <i>G01N 27/327</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/58</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 33/543</i> (2013.01)
 <i>G01N 27/3271</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0018679
 (22) 출원일자 2015년02월06일
 심사청구일자 2015년02월06일</p> | <p>(71) 출원인
 인천대학교 산학협력단
 인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)</p> <p>(72) 발명자
 김규원
 인천광역시 연수구 청능대로 124 117동 104호 (동춘동, 금호동아아파트)</p> <p>모히불칸
 인천광역시 연수구 아카데미로 199</p> <p>(74) 대리인
 차준용</p> |
|---|---|

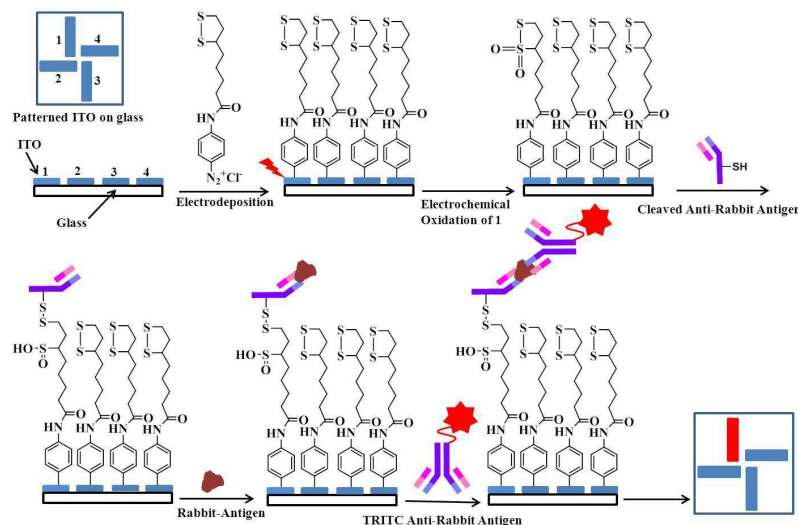
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **디설파이드-말단 아릴디아조늄 염 화합물을 링커로 사용하는 면역분석법**

(57) 요약

본 발명은 디설파이드-말단 아릴디아조늄(Disulfide-confined aryldiazonium salt; DSAD) 염 화합물을 링커로 사용하는 면역분석법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 전기화학적 산화에 의해 활성화되는 디설파이드 부분과 전극(ITO) 내지 환원된 그래핀 산화물(RGO)상에 그래프팅될 수 있는 아릴디아조늄 부분을 동시에 포함하는 특정 구조의 DSAD 염 화합물을 면역센서 플랫폼의 생체분자 고정화용 링커(Linker) 분자로 사용함으로써, 샌드위치 면역분석시 공간-선택적인(Spatially-selective) 표면 고정화를 가능케하고, RGO를 이용한 샌드위치 ELISA 수행시 전기화학적 촉매활성을 극대화할 수 있는 DSAD 염 화합물을 링커로 사용한 새로운 면역분석법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 27/3277 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013058995

부처명 교과부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 박테리오파아지를 활용한 전기화학 바이오센서 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인천대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

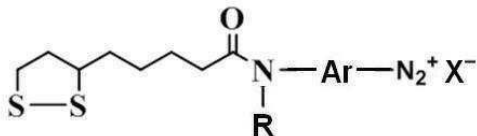
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 디설파이드-말단 아릴디아조늄(Disulfide-confined aryldiazonium; DSAD) 염 화합물을 생체분자 고정화용 링커(Linker)로 사용하는 면역분석법(Immunoassay):

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R은 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 4의 알킬기이고,

Ar은 탄소수 6 내지 30의 아릴기이며,

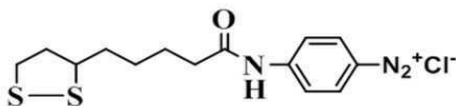
X는 할로젠 원자이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 면역분석법:

[화학식 2]



청구항 3

(1) 제1항 또는 제2항의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 마이크로전극 어레이(Microelectrode array)상에 전착(Electrodeposition)시키는 단계;

(2) 일부 마이크로전극상에 전착된 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 전기화학적으로 산화시켜 표면의 디설파이드기를 티오설피네이트기 또는 티오설포네이트기로 변환 및 활성화하는 단계;

(3) 마이크로전극 어레이에 티올기를 갖는 1차 항체를 노출시켜 상기 활성화된 부분에만 1차 항체를 공간-선택적으로 고정시키는 단계;

(4) 표적항원을 노출 및 고정시키는 단계;

(5) 2차 항체를 노출 및 고정시키는 단계; 및

(6) 마이크로전극 어레이 표면의 형광을 검출하는 단계;

를 포함하는 샌드위치 면역분석법(Sandwich immunoassay).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 마이크로전극 어레이는 ITO(Indium Tin Oxide) 마이크로전극 어레이인 것을 특징으로 하는 샌드위치 면역 분석법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 전착은 순환전압전류법(Cyclic voltammetry; CV)을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 샌드위치 면역분석법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 1차 항체는 Anti-Rabbit antigen, 표적항원은 Rabbit antigen, 2차 항체는 Anti-Rabbit antigen인 것을 특징으로 하는 샌드위치 면역분석법.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 2차 항체는 TRITC(Tetramethylrhodamine isothiocyanate)로 표지된 것임을 특징으로 하는 샌드위치 면역 분석법.

청구항 8

- (1) PEI(Polyethylenimine), 및 전기화학적으로 환원된 그래핀 산화물(Electrochemically reduced graphene oxide; ERGO)로 순차 개질된 ITO 전극 표면(ERGO/PEI/ITO)을 준비하는 단계;
 - (2) 상기 ITO 전극 표면의 ERGO 상에 제1항 또는 제2항의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 전착(Electrodeposition)시켜 DSAD로 기능화된 ERGO 표면(DSAD/ERGO/PEI/ITO)을 얻는 단계;
 - (3) 상기 DSAD로 기능화된 ERGO 표면의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 전기화학적으로 산화시켜 표면의 디설파이드기를 티오설피네이트기 또는 티오설포네이트기로 변환 및 활성화한 표면(ODSAD/ERGO/PEI/ITO)으로 이루어진 전기화학적 면역센서를 제조하는 단계;
 - (4) 상기 활성화된 표면에 티올기를 갖는 1차 항체를 노출 및 고정시키는 단계;
 - (5) 표적항원을 노출 및 고정시키는 단계;
 - (6) 2차 항체를 노출 및 고정시키는 단계; 및
 - (7) 전해질을 노출시켜 화학적 촉매반응을 일으킨 후, 전기화학을 통해 생성된 물질의 양을 순환전압전류법(Cyclic voltammetry; CV)을 이용해 검출해내는 단계;
- 를 포함하는 샌드위치 ELISA 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 (1) 단계는,

피라나 용액(Piranha solution)으로 세척한 ITO 전극을 다시 물로 세척하여 전극 표면에 (-) 전하를 형성하고, 상기 (-) 전하가 형성된 전극을 (+) 전하를 띄는 PEI 수용액으로 전처리한 후, 얻어진 표면에 그래핀 산화물(Graphene oxide; GO)을 형성한 다음, GO를 전기화학적으로 환원시키는 것임을 특징으로 하는 샌드위치 ELISA 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 1차 항체는 Anti-Mouse antigen, 표적항원은 Mouse antigen, 2차 항체는 Anti-Mouse antigen인 것을 특징으로 하는 샌드위치 ELISA 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 2차 항체는 HRP(Horseradish peroxidase)로 표지된 것임을 특징으로 하는 샌드위치 ELISA 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 (7) 단계는,

전해질로서 과산화수소 및 하이드로퀴논 용액을 전기화학적 면역센서의 전극에 노출시켜 화학적 촉매반응을 일으킨 후, 생성된 벤조퀴논의 양을 순환전압전류법을 이용해 검출해내는 것임을 특징으로 하는 샌드위치 ELISA 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디설파이드-말단 아릴디아조늄(Disulfide-confined aryldiazonium salt; DSAD) 염 화합물을 링커로 사용하는 면역분석법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 전기화학적 산화에 의해 활성화되는 디설파이드 부분과 전극(ITO) 내지 환원된 그래핀 산화물(RGO)상에 그래프팅될 수 있는 아릴디아조늄 부분을 동시에 포함하는 특정 구조의 DSAD 염 화합물을 면역센서 플랫폼의 생체분자 고정화용 링커(Linker) 분자로 사용함으로써, 샌드위치 면역분석시 공간-선택적인(Spatially-selective) 표면 고정화를 가능케하고, RGO를 이용한 샌드위치 ELISA 수행시 전기화학적 촉매활성을 극대화할 수 있는 DSAD 염 화합물을 링커로 사용한 새로운 면역분석법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 화학적 센서 또는 생화학적 센서에 있어, 요구되는 최종적인 화학 기능성을 갖도록 해당 표면을 조절하는 것은 매우 중요한 요소이다. 이처럼 표면을 개질하는 다수의 방법들이 존재하며, 잘 알려진 방법으로는 금(Gold) 위에 알칸 티올의 자기조립 단분자막(Self-assembled monolayer; SAM)을 형성하는 기술, ITO(Indium Tin Oxide) 또는 글래스 위에서 유기 실란의 실란화를 수행하는 기술, 및 금속, 탄소 또는 반도체 위에서 디아조늄 염을 전기화학적으로 환원시키는 기술을 들 수 있다.

[0003] 이러한 기술들 중 디아조늄 염의 전기화학적 그래프팅은 간편성, 안정성 및 공정시간의 측면에서 보다 유리한

장점을 제공하며, 방법의 다양성 측면에서도 많은 관심을 끌고 있다.

- [0004] 한편, 공간-선택적인(Spatially-selective) 표면 고정화를 얻기 위해서는 해당 표면과 고정대상 분자 사이에 공유결합을 형성할 수 있는 고반응성 구조를 디자인하는 것이 중요하다. 예를 들어, 디설파이드(Disulfide)의 활성화된 형태, 즉 티오설파페이트(Thiosulfinate)기 또는 티오설파네이트(Thiosulfonate)기는 생체분자의 티올(-SH)기와 공유결합을 형성할 수 있는바, 바이오센서 분야에 매우 유리하게 적용될 수 있다. 이러한 측면에서, 본 발명자들은 근래 디설파이드로 말단이 제한된 멀티바이오기능화용 실란 분자에 대해 보고한바 있다.
- [0005] 그러나, 링커(Linker) 분자로 사용하기 위한 디설파이드-말단 아릴디아조늄(Disulfide-confined aryldiazonium salt; DSAD)에 관한 연구는 아직까지 전무하다. 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD)은 표면 그래프팅 기술과 관련하여 탁월한 특징을 지니는바 이에 대한 구체적인 연구개발이 필요하다.
- [0006] 한편, sp^2 -혼성 단일 원자 두께의 탄소층인 환원된 그래핀 산화물(Reduced graphene oxide; RGO)은 특유의 전기적, 기계적 및 광학적 특성을 지닌 매우 흥미로운 물질로 주목받고 있다.
- [0007] 이러한 환원된 그래핀 산화물(RGO)은 잠재적 적용범위가 매우 큰 물질이지만, 이를 바이오센서 등의 용도로 사용하기 위해서는 적절한 기능화가 필요하다. 이에 그래핀을 기능화하기 위한 연구들, 예컨대 다양한 디아조늄을 환원된 그래핀 산화물(RGO)상에 그래프팅하기 위한 연구가 진행되고 있다.
- [0008] 그러나, 디아조늄을 환원된 그래핀 산화물(RGO)상에 효율적으로 그래프팅하여 환원된 그래핀 산화물(RGO)을 바이오센서의 용도에 적합하도록 기능화하는 괄목할만한 기술은 아직까지 개발되지 않은 상황이다.
- [0009] 요컨대, 활성화가 가능한 부분과 환원된 그래핀 산화물(RGO)상에 효과적으로 그래프팅될 수 있는 부분을 동시에 포함하는 새로운 구조의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 발굴하고, 이를 면역센서 플랫폼의 생체분자 고정화용 링커(Linker) 분자로 사용하여 공간-선택적인(Spatially-selective) 표면 고정화와 함께, RGO를 이용한 전기화학적 면역분석에 있어 센서에 필요한 (촉매)활성을 극대화할 수 새로운 면역분석법에 대한 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0448880호
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-1994-0011640호

발명의 내용

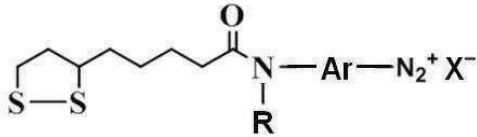
해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자 한 것으로, 신규한 구조의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 생체분자 고정화용 링커로 사용하는 면역분석법을 제공한다.
- [0012] 구체적으로, 본 발명은 상기 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 링커로 이용한 면역분석법의 두 가지 태양으로서, 1) 공간-선택적인(Spatially-selective) 표면 고정화가 가능한 샌드위치 면역분석법, 및 2) RGO를 이용한 전기화학적 면역분석시 전기화학적 촉매활성 및 검출능을 극대화할 수 있는 샌드위치 ELISA 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 디설파이드-말단 아릴디아조늄 (Disulfide-confined aryldiazonium; DSAD) 염 화합물, 더욱 상세하게는 하기 화학식 2로 표시되는 5-(1,2-티올란-3-일)-펜탄아마이드-4-벤젠 디아조늄 클로라이드를 생체분자 고정화용 링커(Linker)로 사용하는 면역분석법(Immunoassay)을 제공한다.

[0014] [화학식 1]



[0015]

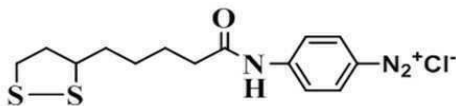
[0016] (상기 화학식 1에서,

[0017] R은 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 4의 알킬기이고,

[0018] Ar은 탄소수 6 내지 30의 아릴기이며,

[0019] X는 할로겐 원자이다.)

[0020] [화학식 2]



[0021]

[0022] 제1 구체예로, 본 발명은 (1) 전술한 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 마이크로전극 어레이 (Microelectrode array)상에 전착(Electrodeposition)시키는 단계; (2) 일부 마이크로전극상에 전착된 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 전기화학적으로 산화시켜 표면의 디설파이드기를 티오설피네이트기 또는 티오설폴로네이트기로 변환 및 활성화하는 단계; (3) 마이크로전극 어레이에 티올기를 갖는 1차 항체를 노출시켜 상기 활성화된 부분에만 1차 항체를 공간-선택적으로 고정시키는 단계; (4) 표적항원을 노출 및 고정시키는 단계; (5) 2차 항체를 노출 및 고정시키는 단계; 및 (6) 마이크로전극 어레이 표면의 형광을 검출하는 단계;를 포함하는 샌드위치 면역분석법(Sandwich immunoassay)을 제공한다.

[0023] 여기서, 상기 마이크로전극 어레이는 ITO(Indium Tin Oxide) 마이크로전극 어레이일 수 있고, 상기 전착은 순환 전압전류법(Cyclic voltammetry; CV)을 통해 수행될 수 있다. 또한 상기 1차 항체는 Anti-Rabbit antigen, 표적항원은 Rabbit antigen, 2차 항체는 Anti-Rabbit antigen일 수 있다. 아울러 상기 2차 항체는 TRITC(Tetramethylrhodamine isothiocyanate)로 표지된 것일 수 있다.

[0024] 제2 구체예로, 본 발명은 (1) PEI(Polyethylenimine), 및 전기화학적으로 환원된 그래핀 산화물 (Electrochemically reduced graphene oxide; ERGO)로 순차 개질된 ITO 전극 표면(ERGO/PEI/ITO)을 준비하는 단계; (2) 상기 ITO 전극 표면의 ERGO 상에 전술한 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 전착 (Electrodeposition)시켜 DSAD로 기능화된 ERGO 표면(DSAD/ERGO/PEI/ITO)을 얻는 단계; (3) 상기 DSAD로 기능화된 ERGO 표면의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 전기화학적으로 산화시켜 표면의 디설파이드기를 티오설피네이트기 또는 티오설폴로네이트기로 변환 및 활성화한 표면(ODSAD/ERGO/PEI/ITO)으로 이루어진 전기화학적 면역센서를 제조하는 단계; (4) 상기 활성화된 표면에 티올기를 갖는 1차 항체를 노출 및 고정시키는 단계; (5) 표적항원을 노출 및 고정시키는 단계; (6) 2차 항체를 노출 및 고정시키는 단계; 및 (7) 전해질을 노출시켜 화학적 촉매반응을 일으킨 후, 전기화학을 통해 생성된 물질의 양을 순환전압전류법(Cyclic voltammetry; CV)을 이용해 검출해내는 단계;를 포함하는 샌드위치 ELISA 방법을 제공한다.

[0025] 여기서, 상기 (1) 단계는, 피라나 용액(Piranha solution)으로 세척한 ITO 전극을 다시 물로 세척하여 전극 표면에 (-) 전하를 형성하고, 상기 (-) 전하가 형성된 전극을 (+) 전하를 띄는 PEI 수용액으로 전처리한 후, 얻어

진 표면에 그래핀 산화물(Graphene oxide; GO)을 형성한 다음, GO를 전기화학적으로 환원시키는 것일 수 있다. 또한 상기 1차 항체는 Anti-Mouse antigen, 표적항원은 Mouse antigen, 2차 항체는 Anti-Mouse antigen일 수 있다. 아울러 상기 2차 항체는 HRP(Horseradish peroxidase)로 표지된 것일 수 있다. 나아가 상기 (7) 단계는, 전해질로서 과산화수소 및 하이드로퀴논 용액을 전기화학적 면역센서의 전극에 노출시켜 화학적 촉매반응을 일으킨 후, 생성된 벤조퀴논의 양을 순환전압전류법을 이용해 검출해내는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따른 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 링커로 사용한 면역분석법은 생체분자(단백질, 항체 등)를 공간-선택적으로 고정화할 수 있으며, 그래핀-기반 면역분석 플랫폼의 전기화학적 촉매활성을 유지하면서 그 검출능을 극대화할 수 있다.
- [0027] 그 결과, 샌드위치 면역분석(형광 검출) 또는 RGO를 이용한 샌드위치 ELISA 수행시 효율적이면서도 고감도로 표적물질을 검출할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명이 제공하는 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 생체분자의 공간-선택적 고정화용 링커로 사용하면 초고속 검출 또는 제한 방출(Restricted release)과 같은 다양한 분야의 바이오칩을 제조할 수 있다.
- [0029] 아울러, 본 발명이 제공하는 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 그래핀-기반 면역분석 플랫폼 제조를 위한 링커로 사용하면 그래핀(예컨대, RGO)이 공유결합적으로 기능화되어 그 표면을 단백질, 핵산과 같은 다양한 생체분자로서 효과적으로 처리할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 본 발명에 사용되는 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물의 제조방법을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 통해 ITO 전극 표면을 공간-선택적 방식으로 개질하는 방법 및 이를 이용한 Rabbit antigen 검출과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- 도 3은 본 발명의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물로 ERGO 표면을 기능화하는 방법 및 샌드위치 ELISA 기법을 이용한 Mouse antigen 검출과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- 도 4의 (A)는 ITO 마이크로전극상에 1.5mM DSAD(0.1M HCl)를 전착한 경우에 대한 스캔속도 $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서의 CV 곡선; (B)는 0.1M TBAP(95% ACN)를 사용하여 DSAD/ITO를 전기화학적 산화시킨 경우에 대한 스캔속도 $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서의 CV 곡선; (C)는 전기화학적 산화 전 DSAD로 개질된 ITO 표면에 대한 S 2p XPS 결과; (D)는 전기화학적 산화 후 DSAD로 개질된 ITO 표면에 대한 S 2p XPS 결과; (E)는 클리브된 Anti-Rabbit antigen의 공간-선택적 고정화로부터 얻은 형광현미경 이미지(파선 = ITO 전극의 위치, 스케일바 $150\mu\text{m}$);이다.
- 도 5의 (A)는 0.5M NaCl을 사용하여 GO를 전기화학적 환원시킨 경우에 대한 스캔속도 $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서의 CV 곡선; (B)는 ERGO/PEI/ITO 전극상에 1.5mM DSAD(0.1M HCl)를 전착한 경우에 대한 스캔속도 $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서의 CV 곡선; (C)는 0.1M TBAP(95% ACN)를 사용하여 DSAD/ERGO/PEI/ITO 전극을 전기화학적 산화시킨 경우에 대한 스캔속도 $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서의 CV 곡선; (D)는 1mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ /0.1M KCl 용액 내 스캔속도 $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서의, 미처리된 ITO(실선), ERGO/PEI/ITO(점선), DSAD/ERGO/PEI/ITO(1점 쇄선) 및 ODSAD/ERGO/PEI/ITO(2점 쇄선)의 블로킹 테스트(Blocking test)에 대한 CV 곡선;이다.
- 도 6의 (A)는 각각 다른 개질된 전극에서 1mM BQ(0.1M PBS)의 환원에 대한 스캔속도 $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서의 CV 곡선; (B)는 2mM HQ 및 1.5mM H_2O_2 를 포함하는 0.1M PBS에서, Mouse antigen 및 Rabbit antigen($1\mu\text{g}/\text{mL}$) 검출용 면역센서의 스캔속도 $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서의 CV 응답 결과; (C)는 2mM HQ 및 1.5mM H_2O_2 를 포함하는 0.1M PBS에서, 각각 다른

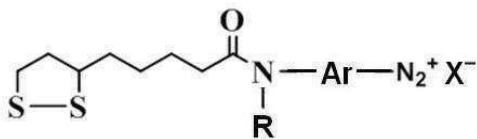
농도의 Mouse antigen을 검출하기 위한 면역센서의 스캔속도 $50\text{mV}\text{s}^{-1}$ 에서의 CV 응답 결과; (D)는 각각 다른 Mouse antigen 농도에서의 면역센서 응답에 대한 Calibration curve;이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

본 발명의 면역분석법(Immunoassay)은 하기 화학식 1로 표시되는 디설파이드-말단 아릴디아조늄(Disulfide-confined arylldiazonium; DSAD) 염 화합물, 더욱 구체적으로는 하기 화학식 2로 표시되는 5-(1,2-디티올란-3-일)펜탄아마이드-4-벤젠 디아조늄 클로라이드를 생체분자 고정화용 링커(Linker)로 사용하는 것이다.

[화학식 1]



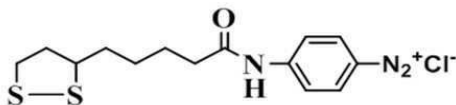
(상기 화학식 1에서,

R은 수소 원자 또는 탄소수 1 내지 4의 알킬기이고,

Ar은 탄소수 6 내지 30의 아릴기이며,

X는 할로젠 원자이다.)

[화학식 2]



본 발명에 사용되는 상기 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물은 전기화학적 산화에 의해 활성화되는 디설파이드 부분과 전극(ITO) 내지 환원된 그래핀 산화물(RGO)상에 그래프팅될 수 있는 아릴디아조늄 부분을 동시에 포함함으로써, 공간-선택적인(Spatially-selective) 표면 고정화를 가능케하고, 항체 등 생체분자가 효과적으로 고정될 수 있도록 한다.

구체적으로, 본 발명의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물은 표적물질 검출을 위한 다양한 면역분석 플랫폼(Immunoassay platform) 및 바이오센서의 생체분자 고정화용 링커(Linker)로서 매우 유용하게 사용될 수 있는바, 예를 들어 상기 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 전기화학적 산화시키면 디설파이드 부분이 티오설파피네이트(Thiosulfinate)기 또는 티오설파포네이트(Thiosulfonate)기로 활성화되고, 이처럼 활성화된 부분이 생체분자의 티올(-SH)기와 공유결합을 형성하여 생체분자를 효율적으로 고정시킬 수 있다.

상기 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물은 리포산을 반응물로 하여 디티올란 부분을 포함하는 카바메이트계 화합물을 합성하고; Boc 부분을 제거한 다음; 할로젠 음이온을 도입하는 과정을 거쳐 제조될 수 있다.

일 구체예로, 본 발명에 따른 상기 화학식 2의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물은,

a) 리포산과 N-Boc-1,4-페닐렌디아민을 트리에틸아민(TEA), 하이드록시벤조트리아졸(HOBt) 및 EDCI(1-ethyl-3[3-(dimethyl amino)propyl]-carbodiimide hydrochloride) 하에서 반응시켜 터트-부틸 4-(5-(1,2-디티올란-3-일)펜탄아마이드)페닐카바메이트를 합성하는 단계;

b) 상기 a) 단계의 합성물을 디클로로메탄(DCM) 및 트리플루오로아세트산(TFA)의 혼합물에 용해시켜 N-(4-아미노페닐)-5-(1,2-디티올란-3-일)펜탄아마이드를 합성하는 단계; 및

- [0047] c) 상기 b) 단계의 합성물을 염산(HCl)에 용해시키고, 아질산나트륨(NaNO_2)을 첨가하여 5-(1,2-디티올란-3-일)펜탄아마이드-4-벤젠 디아조늄 클로라이드를 수득하는 단계;를 통해 제조될 수 있다(도 1 참조).
- [0048] 본 발명의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 생체분자 고정화용 링커로 사용하는 면역분석법에서, 상기 생체분자로 티올기 등을 지녀 활성화된 DSAD 염 화합물과 결합할 수 있고, 또한 표적물질과 특이적으로 결합할 수 있는 모든 물질이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체, 항원, DNA, RNA 또는 PNA를 포함하는 핵산, 단백질 또는 올리고펩타이드, 지질, 카보하이드레이트 등이 사용될 수 있다. 여기서, 상기 단백질에는 Antibody, HIV p24, Combo, RgpIII, HCV core, NS5, NS3, E1/E2, HBV surface antigen 및 IgG-Cy3 등과 함께, 감염성 질병 진단(Infectious disease diagnosis)용 항원 혹은 항체, 또는 AFP, PSA, CA1-1, glypEACN을 포함한 암진단(Cancer diagnosis)용 항원 혹은 항체 및 활성 측정용 효소(독성분석, 환경분석, 식품균 분석에 이용되는 효소 등)가 포함된다. 또한 신약 개발에 사용되는 저분자 물질 및 자생식물, 미생물, 곰팡이, 한약재 등의 천연물 역시 고정화의 대상에 포함된다. 상기 표적물질은 본 발명에 따른 면역분석법을 이용하여 검출 가능한 물질을 모두 포함하며, 예를 들어 항원, 핵산, 금속이온 및 글루코스(Glucose) 등을 들 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 생체분자 고정화용 링커로 사용하는 면역분석법은 크게 아래와 같은 두 가지 방식으로 수행될 수 있다.
- [0050] 첫째는, 상기 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 고밀도로 패터닝된 마이크로전극 어레이(Microelectrode array)상에 전착(Electrodeposition, Cathodic deposition) 및 활성화하는 공간-선택적인(Spatially-selective) 방식의 처리를 통해 형광 기반 샌드위치 면역분석법(Sandwich immunoassay)을 수행하는 것이다. 이러한 방식은 예를 들어 Rabbit antigen의 검출에 특이적으로 적용될 수 있다.
- [0051] 구체적으로, 본 방식은
- [0052] (1) DSAD 염 화합물을 순환전압전류법(CV)을 통해 ITO(Indium Tin Oxide) 마이크로전극 어레이상에 전착시키는 단계;
- [0053] (2) 일부 ITO 마이크로전극상에 전착된 DSAD 염 화합물을 전기화학적으로 산화시켜 표면의 디설파이드기를 티오설피네이트기($\text{R}^1\text{-S-SO-R}^2$) 또는 티오설피노네이트기($\text{R}^1\text{-S-SO}_2\text{-R}^2$)로 변환 및 활성화하는 단계;
- [0054] (3) 티올기를 갖는 생체분자(1차 항체)(예컨대, Anti-Rabbit antigen)를 노출시켜 활성화된 부분에만 생체분자를 공간-선택적으로 고정시키는 단계;
- [0055] (4) 표적물질(표적항원)(예컨대, Rabbit antigen)을 노출 및 고정시키는 단계;
- [0056] (5) TRITC(Tetramethylrhodamine isothiocyanate)로 표지된 2차 항체(예컨대, Anti-Rabbit antigen)를 노출 및 고정시키는 단계;
- [0057] (6) 표면을 형광현미경으로 관찰하는 단계;
- [0058] 를 거쳐 표적물질을 형광 검출할 수 있다(도 2 참조).
- [0059] 둘째는, 전기화학적 면역분석법(Electrochemical immunoassay)으로서, 상기 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 전극상에 존재하는 환원된 그래핀 산화물(Reduced graphene oxide; RGO), 예컨대 전기화학적으로 환원된 그래핀 산화물(Electrochemically reduced graphene oxide; ERGO)상에 전착(전기화학적 그래프팅)시켜 상호 결합에 의해 전기화학적 촉매활성을 유지, 증대시키는 방식을 통해 샌드위치 ELISA를 수행하는 것이다. 이러한 방식은 예를 들어 Mouse antigen의 전기화학적 검출에 특이적으로 적용될 수 있다.
- [0060] 구체적으로, 본 방식은
- [0061] (1) 피라나 용액(Piranha solution)으로 세척한 ITO 전극을 다시 물로 세척하여 전극 표면에 (-) 전하를 형성하

고, 상기 (-) 전하가 형성된 전극을 (+) 전하를 띄는 PEI(Polyethylenimine) 수용액으로 전처리한 후, 얻어진 표면에 정전기적 상호작용을 통해 그래핀 산화물(Graphene oxide; GO)을 형성한 다음, GO를 전기화학적으로 환원시킴으로써 ERGO로 개질된 ITO 표면(ERGO/PEI/ITO)을 얻는 단계;

[0062] (2) ERGO 상에 DSAD 염 화합물을 전착시켜 DSAD로 기능화된 ERGO 표면(DSAD/ERGO/PEI/ITO)을 얻는 단계;

[0063] (3) DSAD/ERGO/PEI/ITO의 DSAD 염 화합물을 전기화학적으로 산화시켜 표면의 디설파이드기를 티오설파네이트기($R^1-S-SO-R^2$) 또는 티오설포네이트기($R^1-S-SO_2-R^2$)로 변환 및 활성화(ODSAD/ERGO/PEI/ITO 표면 획득)함으로써 전기화학적 면역센서를 제조하는 단계;

[0064] (4) ODSAD/ERGO/PEI/ITO 표면에 티올기를 갖는 1차 항체(예컨대, Anti-Mouse antigen)를 노출 및 고정시키는 단계;

[0065] (5) 표적항원(예컨대, Mouse antigen)을 노출 및 고정시키는 단계;

[0066] (6) HRP로 표지된 2차 항체(예컨대, Anti-Mouse antigen)를 노출 및 고정시키는 단계;

[0067] (7) 전해질(예컨대, 과산화수소 및 하이드로퀴논 용액)을 노출시켜 화학적 촉매반응을 일으킨 후, 전기화학을 통해 생성된 물질(예컨대, 벤조퀴논)의 양을 순환전압전류법(CV)을 이용해 검출해내는 단계;

[0068] 를 거쳐 샌드위치 ELISA 방법으로 표적항원을 전기화학적으로 검출할 수 있다(도 3 참조).

[0069] 본 방식에서, 상기 전착과정 중 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물의 아릴 라디칼은 RGO의 sp^2 탄소 원자와 공유결합을 형성하게 된다. 또한, 과산화수소(H_2O_2) 존재 하에서 HRP(Horseradish peroxidase)는 촉매적 작용으로 하이드로퀴논(HQ)을 벤조퀴논(BQ)으로 변환시키며, 이에 따라 표적항원의 양에 비례하는 신호 전류가 발생된다. ELISA는 항원 검출을 위한 감응성 진단 툴 및 다양한 산업분야에서의 품질 관리를 위해 사용되는 기법으로서, 전기신호(Signal)가 검출시약에 링크된 효소반응 산물에 의해 발생하여 정확한 측정이 가능하고, 감응도는 이러한 전기신호의 증폭에 의존한다. 본 발명에 따른 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물을 사용한 바이오센서 플랫폼은 전기화학적 ELISA 기법에 적용시 표적물질, 특히 Mouse antigen에 대한 감응도 및 특이도가 우수한 것으로 나타났다.

[0070] 한편, 본 발명이 제공하는 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물은 아릴디아조늄 부분이 다양한 고체 표면(예컨대, 그래핀, 그래파이트 및 다이아몬드와 같은 탄소계 물질; 금; 백금; ITO; 등)에 대해 높은 반응성을 지니는바, 공유결합적 고정화를 통한 다양한 기능성 나노물질 표면의 개질과 관련하여서도 매우 유용한 링커 분자로서 사용될 수 있을 것이다.

[0071] 이하, 제조예, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 제조예, 실시예 및 실험예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0072] 제조예: 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물의 합성

[0073] (1) 시약 및 장치

[0074] 리포산(LA), N-Boc-1,4-페닐렌디아민, 트리에틸아민(TEA), 하이드록시벤조트리아졸(HOBt), EDCI, 테트라부틸암모늄 과염소산염(TBAP), 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP), 그래파이트 분말($<20\mu m$), 황산(H_2SO_4), 과산화수소(H_2O_2), 염산(HCl), 아질산나트륨($NaNO_2$), 염화나트륨(NaCl), Rabbit antigen, Mouse antigen, Anti-Rabbit antigen, Anti-Mouse antigen, Anti-Rabbit antigen TRITC 및 Anti-Mouse antigen HRP를 Sigma Aldrich社로부터 입수하였다.

[0075] 포스페이트-버퍼 살린(PBS) 용액은 0.01M 포스페이트 및 0.15M NaCl로 구성된 것을 사용하고, PBST는 PBS 및 0.05%(w/w) Tween-20으로 구성된 것을 사용하였다.

- [0076] 모든 화학약품은 분석용 등급으로서, 추가적인 정제없이 사용하였다.
- [0077] 모든 버퍼 및 수용액은 18.2MΩ 순수로 제조하였다.
- [0078] 형광이미징(Fluorescence imaging), 순환전압전류법(Cyclic voltammetry; CV) 및 X-선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy; XPS)은 종래 Haque et al., 2012에서 보고된 것과 동일한 기기를 사용하여 수행하였다.
- [0079] (2) 터트-부틸 4-(5-(1,2-디티올란-3-일)펜탄아마이드)페닐카바메이트의 합성: (1a)
- [0080] 디클로로메탄(DCM)에 녹인 리포산 용액에 N-Boc-1,4-페닐렌디아민, 트리에틸아민(TEA), 하이드록시벤조트리아졸(HOBt), EDCI 및 추가적인 트리에틸아민(TEA)을 연속해서 가하였다.
- [0081] 이어서, 반응 혼합물을 25℃에서 밤새 교반하고, 물로 희석하였다.
- [0082] 생성물을 디클로로메탄(DCM)으로 추출하고, 황산마그네슘을 이용하여 건조한 뒤, 감압 하에서 여과 및 농축하였다.
- [0083] 얻어진 적갈색 분말을 디에틸에테르에 서스펜션시킨 후, 여과 및 에테르로 린스하여 담홍색 분말을 수득하였다(수율 80.5%).
- [0084] ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm = 1.25 (s, 1H, CH₂); 1.91 (s, 9H, BOC); 1.61 (s, 1H, CH₂); 1.68-1.78 (m, 4H, CH₂); 1.91-1.94(t, 1H, -S-CH₂); 2.32-2.36 (t, 2H, CH₂); 2.43-2.48 (q, 1H, -S-CH₂); 3.10-3.18 (m, 2H, CH₂), 3.56-3.59 (t, 1H, -S-CH-); 6.46 (s, 1H, CONH); 7.18 (s, 1H, CONH-BOC); 7.26-7.31 (d, 2H, arom); 7.41-7.43 (d, 2H, arom).
- [0085] (3) N-(4-아미노페닐)-5-(1,2-디티올란-3-일)펜탄아마이드의 합성: (2a)
- [0086] 화합물 1a(210.97mg, 0.532mM)를 6.666mL dry DCM:TFA(10:1) 혼합물에 용해시키고, 실온에서 밤새 교반한 다음, 물로 세척한 후 DCM으로 추출하였다.
- [0087] 얻어진 용액을 황산마그네슘을 이용하여 건조하고, 감압 하에서 농축하였다.
- [0088] 이어서, 실리카-겔 컬럼(mobile phase 5% methanol in DCM)상에서 정제를 수행하여 베이지색 고체를 수득하였다(수율 21%).
- [0089] ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm = 0.83-0.85 (d, 1H, CH₂); 1.23-1.26 (d, 1H, CH₂); 1.36-1.40 (t, 2H, CH₂); 1.56-1.59 (t, 2H, CH₂); 1.68-1.70 (m, 1H, CH₂); 1.84-1.89 (m, 1H, CH₂); 2.20-2.23 (t, 1H, CH₂); 2.39-2.45 (m, 1H, CH₂); 3.09-3.21 (m, 2H, CH₂); 3.59-3.66 (m, 1H, -S-CH-); 4.87 (s, 2H, NH₂); 6.46-6.49 (d, 2H, arom); 7.19-7.21 (d, 2H, arom); 9.45 (s, 1H, CONH).
- [0090] (4) 5-(1,2-디티올란-3-일)펜탄아마이드-4-벤젠 디아조늄 클로라이드의 합성
- [0091] 화합물 2a(0.889mg)를 0.1M HCl 1.9mL에 용해시키고, 아이스 배스에서 차갑게 하여 1.5mM 용액 2mL를 제조하였다.
- [0092] 이에, 차가운 NaNO₂(0.1mL H₂O 내 0.23mg) 100 μL를 교반하면서 적가하였다.
- [0093] 30분간 더 교반을 계속하여 디설파이드-말단 아릴디아조늄(DSAD) 염 화합물 용액을 최종적으로 수득하였으며, 이를 후술하는 실시예의 전작과정에 사용하였다.
- [0094] 실시예 1: 마이크로전극 어레이상의 항체 고정화 및 샌드위치 면역분석
- [0095] ITO 마이크로전극 어레이를 피라나 용액(H₂SO₄:H₂O₂=3:1)으로 세척한 후, 다량의 물로 다시 세척하고 N₂ 가스로

건조시켰다.

- [0096] 이어서, 상기 제조예에서 준비된 DSAD를 4개의 마이크로전극상에 전착시킨 다음, 하나의 마이크로전극만을 전기화학적으로 산화시켜 티오설피네이트기 또는 티오설폴로네이트기를 생성하였다.
- [0097] 어레이 표면을 PBST 내의 클리브된(Cleaved) Anti-Rabbit antigen 절편에 2시간 동안 노출시킨 다음, PBST 및 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0098] 이어서, 어레이 표면을 50 μL의 Rabbit antigen 용액(PBST 내 5 μg/mL Rabbit antigen)으로 1시간 동안 처리한 다음, PBST 및 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0099] 어레이 표면을 50 μL의 TRITC로 표지된 Anti-Rabbit antigen 용액(PBST 내 20 μg/mL Anti-Rabbit antigen)에 1시간 동안 노출시킨 다음, 얻어진 표면을 형광현미경으로 관찰하였다.

[0100] 실시예 2: 샌드위치 ELISA

[0101] (1) ODSAD/ERGO/PEI/ITO 표면의 제조

- [0102] 종래 Khan et al., 2014에서 보고한 바에 따라, GO를 합성하고 특성화하였다.
- [0103] ITO 전극을 2.5 X 1 cm²의 크기로 절단한 다음, 피라나 용액 및 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0104] 이어서, ITO 전극을 25℃에서 1% PEI 수용액 100 μL에 1시간 동안 노출시킨 다음, 표면을 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0105] 상기 개질된 표면을 0.2mg/mL GO로 3시간 동안 처리한 다음, 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0106] 이어서, 얻어진 GO/PEI/ITO 표면을 0.5M NaCl을 사용하여 전기화학적으로 환원시켰다.
- [0107] 이처럼 얻어진 ERGO로 개질된 표면상에 DSAD를 전착시켰다.
- [0108] 이어서, DSAD/ERGO/PEI/ITO를 0.1M TBAP(95% ACN)를 사용하여 전기화학적으로 산화시켜 산화된 DSAD/ERGO/PEI/ITO(= ODSAD/ERGO/PEI/ITO) 표면을 얻었다.

[0109] (2) 면역센서 전극의 제조 및 ELISA 수행

- [0110] ODSAD/ERGO/PEI/ITO 표면 위에 클리브된 Anti-Mouse antigen(100 μg/mL) 100 μL를 적하하여 Anti-Mouse antigen을 고정화한 후, 2시간 동안 인큐베이트시킨 다음, PBST 및 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0111] 이어서, 표면을 PBS 내의 1% 소 혈청 알부민(BSA) 용액으로 1시간 동안 처리하여 표면상의 비특이적 결합 부위를 차단한 다음, 개질된 표면을 PBS 및 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0112] 각각 다른 농도를 갖는 PBST 내 Mouse antigen 100 μL를 상기 표면상에 1시간 동안 노출시킨 다음, PBST 및 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0113] 이어서, Anti-Mouse antigen HRP(PBST 내 20 μg/mL) 100 μL를 개질된 표면상에 노출시키고 1시간 동안 인큐베이트시킨 다음, 표면을 PBST 및 물로 세척하고 N₂ 가스로 건조시켰다.
- [0114] 비교실험을 위해, Mouse antigen 대신, antigen을 사용하지 않거나 Rabbit antigen을 사용한 것을 음성 대조군으로 삼았다.
- [0115] 상기의 모든 절차들은 25℃에서 수행되었다.

[0116] (3) 순환전압전류법에 의한 항원의 검출

- [0117] 작업전극의 활성 면적은 0.45cm²로 하였다.

- [0118] 셀에서 0.1M PBS 내의 1.5mM H_2O_2 및 2.0mM 하이드로퀴논(HQ)을 실온에서 5분간 손대지 않고 그대로 유지시켜 효소적 검출을 시도하였다.
- [0119] 그 결과, 벤조퀴논(BQ)의 환원에 관한 전기화학적 환원 전류가 얻어졌으며, 각 Mouse antigen 농도에 대해 3번의 측정을 수행하였다.
- [0120] 실험예: 결과 검토
- [0121] (1) DSAD의 공간-선택적 고정화
- [0122] 도 2에서 보듯이, DSAD는 4개의 서로 다른 ITO 마이크로전극에 그래프팅되었고, 이후 전극 1만이 전기화학적으로 산화되었다.
- [0123] 이어서, 클리브된 Anti-Rabbit antigen이 상기 4개의 전극에 노출된 후, Rabbit antigen 및 TRITC로 표지된 Anti-Rabbit antigen이 순서대로 노출되었다. 최종적으로 얻어진 표면을 형광현미경으로 조사하여 Rabbit antigen을 검출하였다.
- [0124] 순환전압전류법(Cyclic voltammetry; CV)을 통해 DSAD 양이온을 ITO 마이크로전극상에 전착시킨 결과, 첫번째 사이클 도중 -0.35V에서 큰 비가역적 환원 전류가 나타났고, 두번째 사이클에서는 전류가 크게 감소하였다(도 4의 (A) 참조). 즉, ITO 전극상에 전착이 매우 효과적으로 이루어졌음을 알 수 있다.
- [0125] DSAD로 개질된 ITO 전극을 전기화학적으로 산화시킨 결과, DSAD의 전기화학적 산화는 첫번째 사이클 도중 0.85V 및 1.2V에서 2개의 연속적인 비가역적 웨이브를 생성하였고, 다음 사이클들에서는 사라졌다(도 4의 (B) 참조). 이러한 2개의 웨이브는 디설파이드의 산화에 관한 2개의 단계에 기인한 것이다(Gourcy et al., 1981 참조).
- [0126] 또한, 표면을 X-선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy; XPS)으로 조사한 결과, Sulfur 2p XPS는 결합에너지 163.5 및 164.5eV에서 2개의 피크를 지녔는데, 이는 각각 설파이드기의 S 2p_{3/2} 및 S 2p_{1/2}에 상응하는 것이다(도 4의 (C) 참조). 반면, 미처리된 전극에서는 피크가 관찰되지 않았다.
- [0127] 전기화학적 산화 이후, S 2p XPS 스펙트럼은 비-산화된 S 2p_{1/2,3/2}의 강도 감소를 나타내었는데, 이는 산화된 S의 증가와 일치하는 것이다. 167.5 및 168.5eV에서의 이중 피크는 티오설파네이트기 내의 설파네이트(SO_2)에 상응하며, 166.5eV 부근의 추가적인 피크는 티오설파네이트기 내의 설파네이트(SO)에 상응한다(도 4의 (D) 참조). 티오설파네이트는 2e loss로부터, 티오설파네이트는 4e loss로부터 생성되는 것으로 볼 수 있으며(Terashima et al., 2003), 두 가지 관능기 모두 전극 표면에서 생성되었다.
- [0128] (2) Rabbit antigen의 형광-기반 검출
- [0129] TCEP를 사용한 항체 절단(Antibody cleavage)에 따라 준비된 티올기-함유 항체의 고정화를 통해 산화된 표면의 티올 반응성을 조사하였다.
- [0130] 전극 1의 전기화학적 산화 이후 클리브된 Anti-Rabbit antigen(c-Ab-R)을 포함하는 용액을 어레이 표면에 노출시키고, c-Ab-R이 고정된 표면에 Rabbit antigen(Ag-R) 용액을 적하한 다음, 2차 항체로서 TRITC로 표지된 Anti-Rabbit antigen 용액을 노출시켰다.
- [0131] 세척 및 건조를 거쳐 얻어진 표면을 형광현미경으로 조사한 결과, 도 4의 (E)에서 보듯이 오직 산화된 표면에서만 두드러진 붉은색이 관찰되었다. 즉, 이는 고밀도의 마이크로전극 어레이상에서 단백질의 검출이 성공적으로 이루어졌음을 나타낸다.
- [0132] (3) DSAD를 이용한 ERGO의 기능화
- [0133] 도 3은 ERGO로 개질된 ITO를 DSAD로 기능화하는 과정 및 얻어진 표면을 Mouse antigen 검출용 플랫폼으로 사용하는 방법을 나타낸다.
- [0134] 깨끗한 ITO 위에 (+) 전하의 PEI층을 추가적으로 형성하고, 그 위에 정전기적 상호작용을 통해 GO를 흡착시킨

후, GO를 전기화학적으로 환원시켜 ERGO를 얻었다.

- [0135] 포텐셜을 0.0부터 -1.0V까지 스캔하여 실험한 결과, 첫번째 사이클 도중 -0.8V 부근에서 뚜렷한 환원 전류가 관찰되었으며, 나머지 사이클에서는 전류가 크게 감소하였다(도 5의 (A) 참조). 이러한 순환전압전류적 거동은 기 보고된 ITO상 GO 시트의 환원과 유사한 것으로, GO가 성공적으로 환원되었음을 의미하며(Haque et al., 2012), 이러한 표면을 ERGO/PEI/ITO라 지칭하기로 한다.
- [0136] 이어서, ERGO/PEI/ITO상에 DSAD를 전착시켜 DSAD/ERGO/PEI/ITO를 형성하였다.
- [0137] 도 5의 (B)에 ERGO상 DSAD의 전착에 대한 CV 곡선을 나타내었는바, 첫번째 사이클 도중 -0.3V 부근에서 높은 환원 전류가 관찰되었으며, 두번째 및 세번째 사이클에서는 피크가 관찰되지 않았다. 이는 첫번째 사이클을 거쳐 DSAD가 효과적으로 전착되었음을 의미한다.
- [0138] 또한, 도 5의 (C)에 DSAD로 개질된 ERGO 표면의 전기화학적 산화(ODSAD/ERGO/PEI/ITO)에 관한 CV 곡선을 나타내었는바, ERGO상의 디설파이드기가 티오설피네이트기 또는 티오설피포네이트기로 산화되었음을 알 수 있다.
- [0139] 아울러, 도 5의 (D)에 각각 상이하게 개질된 ITO 전극에 대한 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 레독스 프로브를 이용한 CV 곡선을 나타내었는바, 미처리된 ITO 및 ERGO/PEI/ITO의 모양이 거의 동일하였으며, DSAD로 개질된 ERGO는 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 이온에 대해 높은 블로킹 특성을 나타내었다. 산화된 표면(ODSAD/ERGO/PEI/ITO) 역시 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 이온에 대해 높은 블로킹 특성을 나타내었는데, 이는 디아조늄 층이 매우 안정적일 뿐만 아니라 산화 이후에도 분자들이 표면으로부터 크게 탈착되지 않았음을 의미한다.
- [0140] (4) DSAD로 기능화된 ERGO 표면의 전기화학적 촉매활성
- [0141] 각각 상이하게 개질된 ITO 전극의 BQ 환원에 대한 전기화학적 촉매활성을 CV를 통해 조사하여 도 6의 (A)에 나타내었다.
- [0142] 그 결과, ERGO로 개질된 ITO는 BQ의 환원에 대해 미처리된 ITO보다 매우 높은 전기화학적 촉매활성을 나타내었다. 이러한 ERGO 표면의 높은 전기화학적 촉매활성은 ERGO의 넓은 표면적, 높은 전기전도성 및 빠른 이종전자 이동능력에 기인한다(Khan et al., 2013).
- [0143] DSAD로 기능화된 ERGO 표면의 경우 BQ의 전기화학적 환원을 차단하게 되나, 이러한 표면을 전기화학적 산화시킨 후 높은 전기화학적 촉매활성이 다시 나타나게 된다.
- [0144] (5) 면역분석의 전기화학적 성능
- [0145] 실시예 2에 따른 ODSAD/ERGO/PEI/ITO 표면상에서, HRP로 표지된 2차 항체를 이용해 Mouse antigen 검출을 위한 샌드위치 ELISA를 수행하였다. 여기서, 면역센서는 PBS 버퍼 내의 HQ 및 H_2O_2 혼합용액에서 작동시켰다. HRP 분자는 H_2O_2 존재 하에서 HQ가 BQ로 산화되도록 촉매하며, 생성된 BQ는 ODSAD/ERGO/PEI/ITO 표면상에서 전기화학적 으로 환원되어 높은 신호 전류를 생성한다.
- [0146] 도 6의 (B)에 HQ 및 H_2O_2 를 포함하는 PBS 버퍼 용액에서의 상기 면역센서의 CV 응답을 나타내었다.
- [0147] 그 결과, Mouse antigen(1 $\mu\text{g/mL}$)에 대해 높은 환원 피크 전류가 얻어졌는바, 이는 고정된 HRP 분자가 표면에서 면역반응을 통한 우수한 촉매활성을 발휘함을 의미한다.
- [0148] 반면, antigen을 사용하지 않은 대조 실험의 경우 CV상 아주 작은 환원 피크 전류만 관찰되었는바, 이는 비-특이적인 단백질의 결합 및 H_2O_2 의 전기화학적 환원에 따른 결과이다. Rabbit antigen을 사용한 대조 실험의 경우 역시 antigen을 사용하지 않은 대조 실험의 경우와 거의 유사하였다.
- [0149] 이러한 결과는, 본 발명에 따른 면역센서가 매우 특이적임을 확인시켜 준다.
- [0150] 도 6 (C)에는 1ng/mL에서 1 $\mu\text{g/mL}$ 까지 각각 서로 다른 Mouse antigen 농도 조건하에서 전극 표면에 대한 CV 응답을 나타내었다.

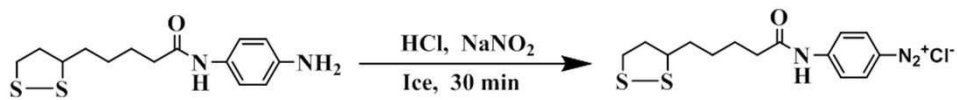
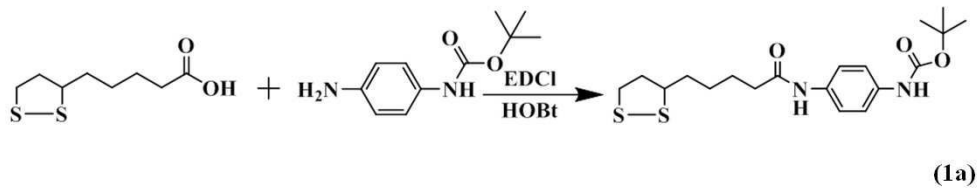
[0151] 그 결과, Mouse antigen의 농도가 증가함에 따라 BQ의 환원 피크 전류가 증가함을 알 수 있다.

[0152] 도 6의 (D)에는 배경분리 환원 피크 전류 vs. Mouse antigen 농도의 로그값으로 도시한 Calibration plot을 나타내었다.

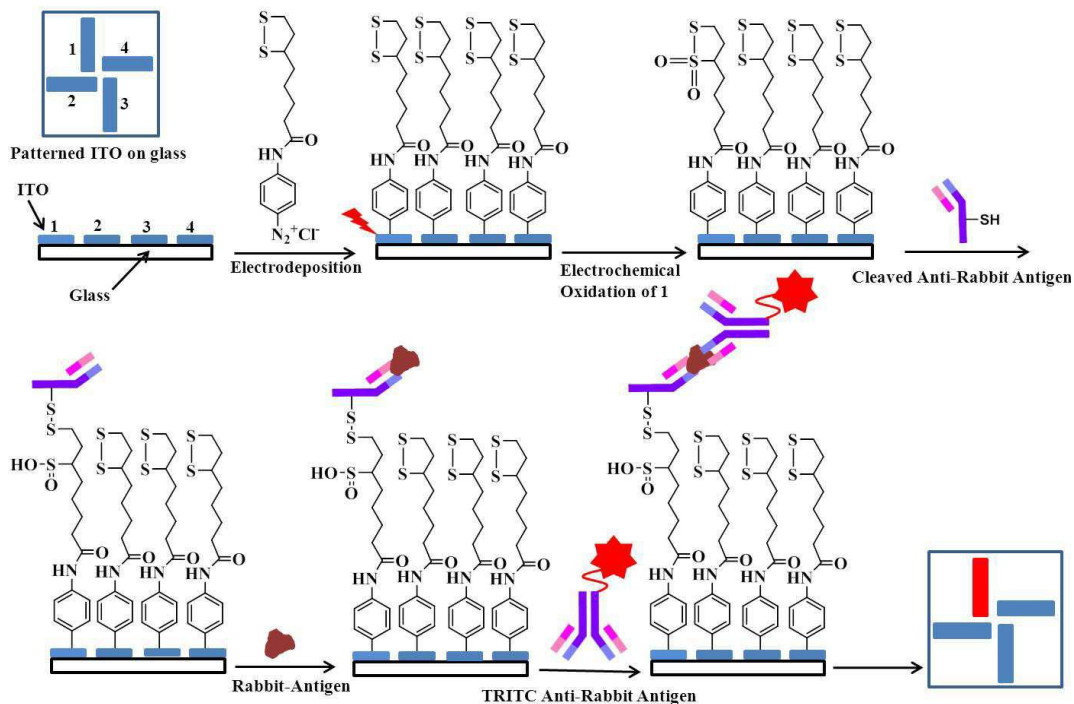
[0153] 그 결과, 넓은 농도 범위에 걸쳐 배경분리 환원 피크 전류 vs. Mouse antigen 농도의 로그값 사이에 선형 관계가 관찰되었으며, Mouse antigen에 대한 검출한계는 1ng/mL로 나타났다.

도면

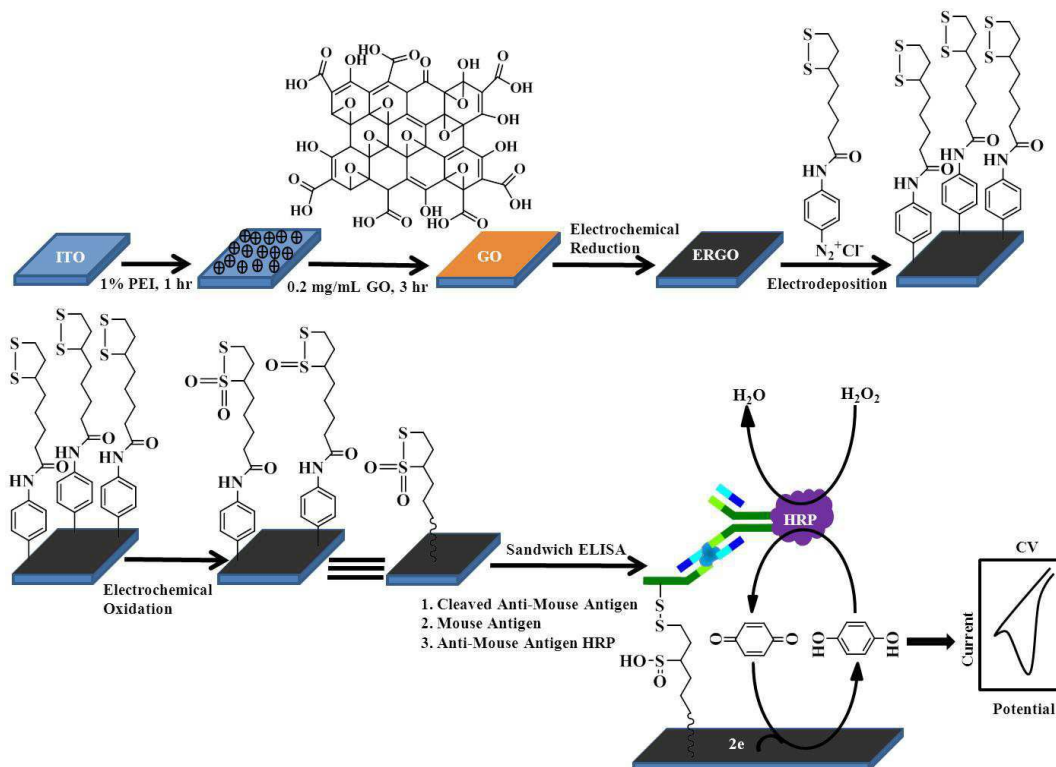
도면1



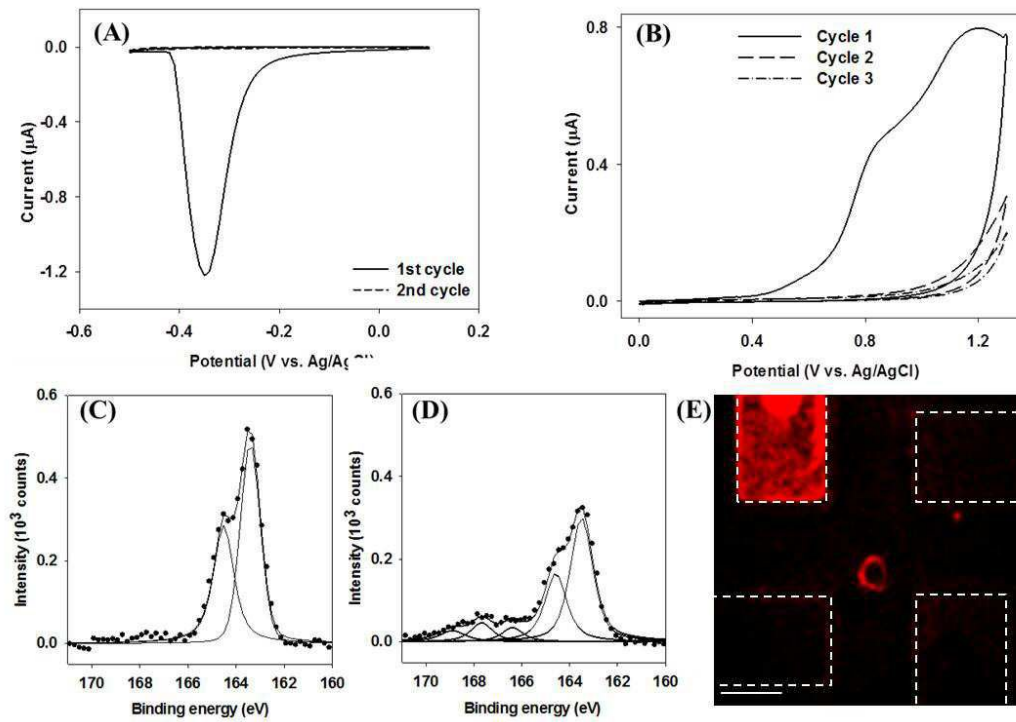
도면2



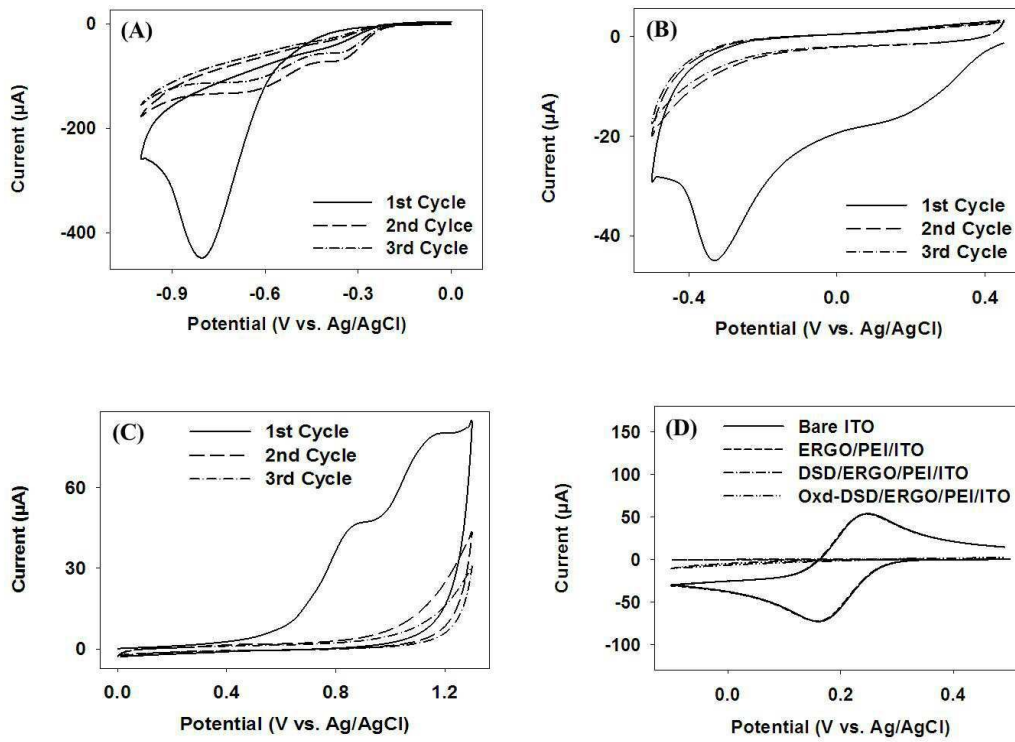
도면3



도면4



도면5



도면6

