



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0134647
(43) 공개일자 2024년09월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/327 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/327 (2021.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0027961
(22) 출원일자 2023년03월02일
심사청구일자 2023년03월02일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박민
서울특별시 마포구 토정로4길 26 ,1층1호(합정동)
허윤정
경기도 용인시 기흥구 예현로 15 서그내마을에스케이아파트 102동 406호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강현욱

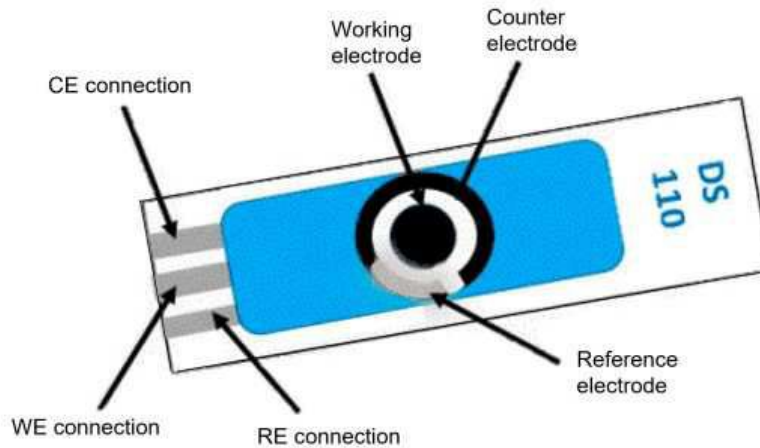
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 효소 고정화 전극, 이의 제조방법, 이를 포함하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서 및 이를 이용하여 콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법

(57) 요약

본 발명은 효소 고정화 전극, 이의 제조방법, 이를 포함하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서 및 이를 이용하여 콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 효소 고정화 전극은 작업 전극, 상기 작업 전극 상에 전착된 그래핀층, 상기 그래핀층 상의 전도성 고분자층 및 상기 전도성 고분자층 상에 생체 물질을 효소 촉매 하는 산화효소가 고정화된 효소층을 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Y 101/03006 (2013.01)

G01N 33/48707 (2013.01)

(72) 발명자

김다현

경기도 파주시 파주읍 주라위길 136-8 펜타빌 5동
203호

한유나

경기도 수원시 영통구 영통로200번길 112

영통SKVIEW 102동 102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345347076

과제번호 2021R1I1A3055700

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 NADH 산화효소 표면발현을 통한 직접전자전달 NADH 바이오센서 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 한림대학교

연구기간 2021.06.01 ~ 2024.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711135202

과제번호 2020R1A4A1016793

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(R&D)

연구과제명 산소 제어 및 병렬 혈액순환 미세유체 시스템 기반 복합 장기칩 연구실

기 여 율 1/2

과제수행기관명 인하대학교

연구기간 2021.06.01 ~ 2026.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

작업 전극;

상기 작업 전극 상에 전착된 그래핀층;

상기 그래핀층 상의 전도성 고분자층; 및

상기 전도성 고분자층 상에 생체 물질을 효소 촉매 하는 산화효소가 고정화된 효소층을 포함하는,

효소 고정화 전극.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 작업 전극은

유리탄소전극(Glassy carbon electrode, GCE)으로 이루어진,

효소 고정화 전극.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 그래핀층은

산화 그래핀(Graphene oxide, GO)으로 이루어진,

효소 고정화 전극.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전도성 고분자는

폴리아세틸렌(polyacetylene, PA), 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT), 폴리파라페닐렌 비닐렌(poly(para-phenylenevinylene), PPV) 및 폴리아닐린(polyaniline, PANI) 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 하는,

효소 고정화 전극.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 산화효소는

콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx)인 것을 특징으로 하는,

효소 고정화 전극.

청구항 6

(1) 유리탄소전극(Glassy carbon electrode, GCE)의 작업 전극 표면에 산화 그래핀(Graphene oxide, GO)을 전 기분해하여 그래핀층을 형성하는 단계;

(2) 상기 그래핀층 상에 전도성 고분자를 고정화 하여 전도성 고분자층을 형성하는 단계; 및

(3) 상기 전도성 고분자층 상에 산화효소를 고정화 하는 단계를 포함하는,
효소 고정화 전극의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 전도성 고분자는

폴리아세틸렌(polyacetylene, PA), 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), PEDOT, 폴리파라페닐렌 비닐렌(poly(para-phenylenevinylene), PPV) 및 폴리아닐린(polyaniline, PANI) 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 하는,

효소 고정화 전극의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 산화효소는

콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx)인 것을 특징으로 하는,

효소 고정화 전극의 제조방법.

청구항 9

제1항의 효소 고정화 전극을 포함하는 전극부;

상기 효소 고정화 전극에 시료를 공급하기 위한 유체 챔버; 및

상기 효소 고정화 전극에서 발생하는 전기화학적 신호를 감지하는 감지부를 포함하고,

상기 유체 챔버는,

흐르는 상태의 상기 시료를 유입하는 시료 유입구; 및

상기 시료가 흘러 나가는 시료 유출구를 포함하는,

콜레스테롤 농도를 측정하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 전극부는,

상기 작용 전극;

상기 작용 전극에 대응되는 상대 전극; 및

상기 작용 전극 전위의 기준을 잡기위한 기준 전극을 포함하는,

콜레스테롤 농도를 측정하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 전도성 고분자는

폴리아세틸렌(polyacetylene, PA), 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), PEDOT, 폴리파라페닐렌 비닐렌(poly(para-phenylenevinylene), PPV) 및 폴리아닐린(polyaniline, PANI) 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 하는,

콜레스테롤 농도를 측정하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 산화효소는

콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx)인 것을 특징으로 하는,

콜레스테롤 농도를 측정하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 유체 챔버와 상기 전극부를 감싸는 하우징을 더 포함하는,

콜레스테롤 농도를 측정하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서.

청구항 14

시료를 수집하는 단계;

상기 시료에서 콜레스테롤을 추출하는 단계; 및

제9항의 콜레스테롤 전기화학 바이오센서를 사용하여 전기화학 반응을 이용하여 추출된 상기 콜레스테롤의 농도를 측정하는 단계를 포함하는,

콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 시료를 수집하는 단계는

마이크로니들을 통해 상기 시료를 수집하는 단계를 포함하는,

콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 시료에서 콜레스테롤을 추출하는 단계는

상기 수집된 시료를 원심 분리하여 상기 콜레스테롤을 추출하는 단계를 포함하는,

콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 시료는

생물학적 시료로서 혈액 또는 혈청 중 어느 하나인,

콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 콜레스테롤 산화효소를 이용하여 콜레스테롤의 농도를 측정하는 효소 고정화 전극, 이의 제조방법, 이를 포함하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서 및 이를 이용하여 콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 콜레스테롤(cholesterol)은 체내의 막 표면에 존재하면서 막을 보호하고, 혈관벽이 찢어지는 것을 예방하며 적혈구의 수명을 오래 보전시킨다. 이러한 콜레스테롤이 부족한 경우, 적혈구의 수명이 짧아져 빈혈이 생기기 쉽고, 출혈성 질환의 위험도가 증가할 수 있다. 반면, 콜레스테롤이 과도한 경우, LDL(Low Density Lipoproteins) 콜레스테롤이 혈관 내피세포에 침투하고 쌓일 수 있고, 혈관이나 지방세포에 저장되어 있는 중성지방이 너무 많은 경우에는 동맥경화증(atherosclerosis)까지 일으킬 수 있다. 이에, 적정량의 콜레스테롤을 유지하여 질병발생을 예방하는 것이 강조되고 있다.
- [0003] 콜레스테롤을 채취하는 방법으로는 침습적 채혈(finger-pricking)방법이 있으나, 최근, 마이크로니들(Microneedle)을 통해 피부의 표피층(epidermis)을 관통하여 바이오마커를 함유한 체액을 채취하는 최소침습적 방법이 많이 연구되고 있다. 1000 μ m보다 짧은 마이크로 크기의 니들은 신경 말단에 도달할 수 없으므로, 사용자는 통증을 느끼지 않으며, 주사에 대한 두려움이 있는 환자들로부터 체액을 용이하게 추출할 수 있는 장점이 있다. 그러나, 마이크로니들을 통해 콜레스테롤을 추출하는 경우, 체액의 양이 미량이어서, 콜레스테롤의 정확한 농도 측정이 어려운 단점이 있다.
- [0004] 콜레스테롤의 농도 측정은 비색(colorimetric), 형광 측정(fluorometric), 분광 광도(spectrophotometric), 고성능 액체 크로마토그래피(high performances liquid chromatigraphy), 화학발광(chemiluminescence) 및 전기화학적 바이오센서(electrochemical biosensor) 등에 의해 이루어지는데, 이때, 바이오마커로 콜레스테롤 산화효소가 사용된다. 구체적으로, 전극 상에 고정된 콜레스테롤 산화효소는 특정 분석 물질에만 부착할 수 있는 성질을 가지므로, 높은 특이성에 의해 신속하면서도 정확한 콜레스테롤의 농도 측정이 가능하다. 이에, 콜레스테롤 산화효소가 전극 내에 잘 고정되지 않는 경우, 정확한 콜레스테롤 농도 측정이 어렵게 된다. 특히, 미량의 체액으로부터 콜레스테롤의 정확한 농도 측정을 위해서는 콜레스테롤 산화효소를 전극 내 최대한 많이 부착시켜야 하며, 효소 고정화 기술이 요구된다.
- [0005] 한편, 전술한 배경기술은 발명자가 본 발명의 도출을 위해 보유하고 있었거나, 본 발명의 도출 과정에서 습득한 기술 정보로서, 반드시 본 발명의 출원 전에 일반 공중에게 공개된 공지기술이라 할 수는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2074316 호 (2020.01.31)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 일 실시예는 전도성 고분자가 고정화된 그래핀 개질의 전극 표면에 생체 물질을 효소 촉매 하는 산화효소를 높은 효율로 고정화한 효소 고정화 전극 및 이의 제조방법을 제공하는 데에 목적이 있다.
- [0008] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상술한 효소 고정화 전극을 포함하는 콜레스테롤의 농도를 측정하는 콜레스테롤 전기화학 바이오센서를 제공할 수 있다.
- [0009] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상술한 효소 고정화 전극을 포함하여 검출 결과에 대한 재현성 및 검출 민감도가 우수하고 휴대 가능한 콜레스테롤 전기화학 바이오센서를 제공하는 데에 목적이 있다.
- [0010] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상술한 콜레스테롤 전기화학 바이오센서를 이용하여 전기화학적 방법으로 시료에 존재하는 콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법을 제공하는 데에 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상술한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본 발명의 일 측면에 따르면 본 발명의 효소 고정화 전극은 작업 전극, 상기 작업 전극 상에 전착된 그래핀층, 상기 그래핀층 상의 전도성 고분자층 및 상기 전도성 고분자층 상에 생체 물질을 효소 촉매 하는 산화효소가 고정화된 효소층을 포함한다.

- [0012] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 작업 전극은 유리탄소전극(Glassy carbon electrode, GCE)으로 이루어질 수 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 그래핀층은 산화 그래핀(Graphene oxide, GO)으로 이루어질 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(polyacetylene, PA), 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT), 상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(polyacetylene, PA), 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT), 폴리파라페닐렌 비닐렌(poly(para-phenylenevinylene), PPV) 및 폴리아닐린(polyaniline, PANI) 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 산화효소는 콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 효소 고정화 전극의 제조방법은 (1) 유리탄소전극(Glassy carbon electrode, GCE)의 작업 전극 표면에 산화 그래핀(Graphene oxide, GO)을 전기분해하여 그래핀층을 형성하는 단계, (2) 상기 그래핀층 상에 전도성 고분자를 고정화 하여 전도성 고분자층을 형성하는 단계 및 (3) 상기 전도성 고분자층 상에 산화효소를 고정화 하는 단계를 포함한다.
- [0017] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(polyacetylene, PA), 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), PEDOT, 폴리파라페닐렌 비닐렌(poly(para-phenylenevinylene), PPV) 및 폴리아닐린(polyaniline, PANI) 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 산화효소는 콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 콜레스테롤 농도를 측정하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서는 본 발명의 효소 고정화 전극을 포함하는 전극부, 상기 효소 고정화 전극에 시료를 공급하기 위한 유체 챔버 및 상기 효소 고정화 전극에서 발생하는 전기화학적 신호를 감지하는 감지부를 포함하고, 상기 유체 챔버는, 흐르는 상태의 상기 시료를 유입하는 시료 유입구 및 상기 시료가 흘러 나가는 시료 유출구를 포함한다.
- [0020] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 전극부는, 상기 작업 전극, 상기 작업 전극에 대응되는 상대 전극 및 상기 작업 전극 전위의 기준을 잡기위한 기준 전극을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(polyacetylene, PA), 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), PEDOT, 폴리파라페닐렌 비닐렌(poly(para-phenylenevinylene), PPV) 및 폴리아닐린(polyaniline, PANI) 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 산화효소는 콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 유체 챔버와 상기 전극부를 감싸는 하우징을 더 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법은 시료를 수집하는 단계, 상기 시료에서 콜레스테롤을 추출하는 단계 및 본 발명의 콜레스테롤 전기화학 바이오센서를 사용하여 전기화학 반응을 이용하여 추출된 상기 콜레스테롤의 농도를 측정하는 단계를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 시료를 수집하는 단계는 마이크로니들을 통해 상기 시료를 수집하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 시료에서 콜레스테롤을 추출하는 단계는 상기 수집된 시료를 원심 분리하여 상기 콜레스테롤을 추출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 시료는 생물학적 시료로서 혈액 또는 혈청 중 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 전술한 본 발명의 과제 해결 수단 중 어느 하나에 의하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극은 콜

레스테롤 산화효소를 고효율로 고정화시킬 수 있으므로, 고정화된 산화효소가 높은 활성을 가져 콜레스테롤의 효소 촉매 활성을 유도할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 과제 해결 수단 중 어느 하나에 의하면, 본 발명의 효소 고정화 전극을 포함하는 콜레스테롤 전기화학 바이오센서는 효소 고정화 전극에 고효율로 산화효소가 고정화되어 있으므로, 높은 민감도로 신속하고 정확하게 콜레스테롤의 농도를 측정할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 과제 해결 수단 중 어느 하나에 의하면, 본 발명의 효소 고정화 전극을 포함하는 콜레스테롤 전기화학 바이오센서는 작동이 편리하고, 크기가 작아 휴대가 용이하므로 사용 장소의 제약이 없고, 다양한 농도의 콜레스테롤을 선택적으로 검출할 수 있어 콜레스테롤 수치의 주기적인 확인이 가능할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 얻을 수 있는 효과는 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극을 포함하는 전기화학 바이오센서를 나타낸 그림이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 제조방법을 나타내는 개략도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극에서 산화 그래핀(Graphene oxide, GO)의 전기분해에 따른 순환 전압전류법 그래프이다.

도 4의 (a) 내지 (c)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극에 고정되는 전도성 고분자 최적화를 위한 나피온(nafion), PANI 및 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)의 순환 전압전류법 그래프들이다.

도 5의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극에 고정되는 산화효소 농도에 따른 콜레스테롤 농도별 피크 전류(peak current) 및 감도를 나타내는 그래프들이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극에 고정되는 산화효소의 buffer pH 별 감도를 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 고정화 단계별 순환 전류전압법 그래프이다.

도 8의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 산화효소 개질 유무에 따른 콜레스테롤 농도별 순환 전류전압법 그래프들이다.

도 9의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 산화효소 개질 유무에 따른 콜레스테롤 농도별 피크 전류(peak current) 그래프들이다.

도 10은 콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx) 및 겨자무과산화효소(Horseradish peroxidase, HRP)의 농도별 비색 효소 분석(colorimetric enzymatic assay)에 대한 그래프이다.

도 11의 (a) 내지 (d)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 고정화 단계별 SEM(Scanning electron microscope) 이미지들이다.

도 12의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로니들을 통해 아가로스 겔에서 추출한 콜레스테롤의 농도별 피크 전류(peak current) 및 실제 콜레스테롤 농도와 계산된 C_d 의 선형 상관(linear correlation)에 대한 그래프들이다.

도 13의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로니들을 통해 돼지 피부에서 추출한 콜레스테롤의 농도별 피크 전류(peak current) 및 실제 콜레스테롤 농도와 계산된 C_d 의 선형 상관(linear correlation)에 대한 그래프들이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 재현성(reproducibility) 테스트 결과를 나타내는 그래프이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 간섭 물질(interference) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0034] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 구성을 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0035] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤 농도를 측정하는 휴대용 콜레스테롤 전기화학 바이오센서는 전극부, 유체 챔버 및 감지부를 포함하고, 유체 챔버는 시료 유입구 및 시료 유출구를 포함한다.
- [0037] 유체 챔버는 효소 고정화 전극에 시료를 공급하기 위해 구성될 수 있다.
- [0038] 이때, 유체 챔버는 전기 신호를 차단하지 않는 재질로 이루어질 수 있다.
- [0039] 한편, 유체 챔버는 시료 유입구 및 시료 유출구를 포함한다.
- [0040] 시료 유입구는 콜레스테롤을 포함하는 시료를 유체 챔버 내로 흐르게 하여 효소 고정화 전극으로 전달하기 위해 구성될 수 있다.
- [0041] 시료 유출구는 효소 고정화 전극을 통과한 시료가 유체 챔버로부터 외부로 흘러 나가게 하기 위해 구성될 수 있다.
- [0042] 감지부는 효소 고정화 전극에서 발생하는 전기화학적 신호를 감지하기 위해 구성될 수 있다. 구체적으로, 감지부는 전극부와 연결되어 전극부로부터 발생하는 전기 신호를 측정함으로써 콜레스테롤의 농도를 측정할 수 있다.
- [0043] 전극부는 콜레스테롤 산화효소가 고정화된 효소 고정화 전극, 상대 전극 및 기준 전극을 포함한다.
- [0044] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극을 포함하는 전기화학 바이오센서를 나타낸 그림이다.
- [0045] 도 1을 참조하면, 효소 고정화 전극은 콜레스테롤 산화효소가 고정되어 콜레스테롤의 농도를 검출할 수 있는 전극으로서, 작업 전극으로 기능한다.
- [0046] 효소 고정화 전극은 작업 전극, 그래핀층, 고분자층 및 효소층으로 구성되어 있으며, 세부 내용은 후술하기로 한다.
- [0047] 상대 전극은 전위가 걸리고 전류가 흐를 수 있도록 하여 전체 회로를 형성하도록 구성될 수 있다.
- [0048] 상대 전극은 백금(Pt), 금(Au), 구리(Cu), 알루미늄(Al), 은(Ag), 니켈(Ni) 및 탄소(C)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 포함하여 구성될 수 있다. 예를 들어, 상대 전극은 유리질 탄소(Glassy carbon)로 구성될 수 있다.
- [0049] 기준 전극은 작업 전극에 걸리는 전위의 기준을 잡아주는 전극으로서, 전극부의 정밀한 제어 및 측정을 하도록 구성될 수 있다.
- [0050] 기준 전극은 은, 금, 백금, 구리 및 알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 금속으로 구성될 수 있다. 본 발명의 기준 전극은 은으로 구성될 수 있다.
- [0051] 작업 전극과 상대 전극 사이에 전압 또는 전류가 인가되면, 전기화학 반응이 유도되고, 전기적 신호가 발생되면, 감지부가 전기적 신호를 감지하여 콜레스테롤의 농도를 측정할 수 있다.
- [0052] 구체적으로, 콜레스테롤의 농도를 측정하는 방법은 시료를 수집하는 단계, 시료에서 콜레스테롤을 추출하는 단계 및 콜레스테롤 전기화학 바이오센서를 사용하여 전기화학 반응을 이용해 추출된 콜레스테롤의 농도를 측정하는 단계를 포함한다.

- [0053] 시료를 수집하는 단계는 마이크로니들을 통해 시료를 수집하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0054] 시료에서 콜레스테롤을 추출하는 단계는 수집된 시료를 원심 분리하여 콜레스테롤을 추출하는 단계를 포함할 수 있다. 구체적으로, 수집된 시료를 포함하고 있는 마이크로니들을 증류수에 넣어 원심 분리하여 회석된 콜레스테롤을 추출할 수 있다.
- [0055] 콜레스테롤 전기화학 바이오센서를 사용하여 전기화학 반응을 이용해 추출된 콜레스테롤의 농도를 측정하는 단계는 추출된 콜레스테롤을 증류수에 넣어 회석된 콜레스테롤을 전기화학 바이오센서를 통해 콜레스테롤의 농도를 측정하도록 수행될 수 있다.
- [0056] 한편, 상술한 바와 같이, 효소 고정화 전극은 작업 전극, 그래핀층, 고분자층 및 효소층으로 구성된다.
- [0057] 작업 전극은 전극 반응 시 전류를 흐르게 하여, 전기화학적 신호가 발생되도록 구성될 수 있다.
- [0058] 작업 전극은 유리탄소전극(Glassy carbon electrode, GCE)으로 이루어질 수 있다.
- [0059] 그래핀층은 작업 전극 상에 전기 전도성을 제공하여 전자 전달 효율을 높일 수 있다.
- [0060] 그래핀층은 산화 그래핀(Graphene oxide, GO)으로 이루어질 수 있다. 구체적으로, 그래핀층은 작업 전극 상에 산화 그래핀을 전기화학적으로 환원시켜 전기 전도성을 제공할 수 있다.
- [0061] 전도성 고분자층은 신호 강도를 향상시켜 작업 전극의 표면 위에 콜레스테롤 산화효소의 고정화를 더욱 견고하게 할 수 있다.
- [0062] 전도성 고분자층은 폴리아세틸렌(polyacetylene, PA), 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT), 폴리파라페닐렌 비닐렌(poly(para-phenylenevinylene), PPV) 및 폴리아닐린(polyaniline, PANI) 중 적어도 어느 하나로 구성될 수 있다.
- [0063] 효소층은 콜레스테롤을 과산화수소(Hydrogen Peroxide, H_2O_2) 및 4-cholestene-3-one으로 산화시켜 콜레스테롤의 농도를 검출할 수 있는 전기화학적 신호를 생성할 수 있다.
- [0064] 효소층은 콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx)로 구성될 수 있다.
- [0065] 효소 고정화 전극은 작업 전극 표면에 산화 그래핀을 전기 분해하고, 산화된 그래핀 상에 전도성 고분자를 고정화하고, 전도성 고분자 상에 산화효소를 고정화 함으로써, 제조될 수 있다.
- [0066] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 제조방법을 나타내는 개략도이다.
- [0067] 도 2를 참조하면, 산화 그래핀의 전기 분해는 유리탄소전극의 작업 전극 표면에서 산화 그래핀이 화학적 환원되면서 발생한 그래핀(Graphene)이 전착될 수 있다.
- [0068] 전도성 고분자의 고정화는 층상자가조립법(Layer-by-Layer Self-Assembly, LbL)을 통해 음전하를 띠는 그래핀과 양전하를 띠는 전도성 고분자가 서로 정전기적 인력으로 인해 고정될 수 있다.
- [0069] 산화효소의 고정화는 전도성 고분자와 콜레스테롤 산화효소가 둘 다 음전하를 띠게 되면서 물리적 흡착(physical adsorption)으로 인해 고정될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극은 콜레스테롤 산화효소가 고효율로 고정화된 효소층을 포함하므로, 추출된 콜레스테롤의 농도를 신속하고 정확하게 측정 또는 검출할 수 있는 효과가 있다.
- [0071] 또한, 효소 고정화 전극은 상술한 효소 고정화 전극 제조방법에 의해 그래핀 상에 전도성 고분자 및 콜레스테롤 산화효소가 단계별로 고정화 되어 콜레스테롤을 정확하게 포착하여 검출할 수 있으므로, 추출된 콜레스테롤을 보다 정량적으로 정확하게 높은 민감도로 측정할 수 있는 장점이 있다.
- [0072] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤 전기화학 바이오센서는 효소 고정화 전극의 콜레스테롤 산화효소가 콜레스테롤을 효소 촉매하기 때문에, 촉매 반응에서 발생한 전기화학 신호를 측정하여 콜레스테롤의 정확한 농도 검출이 가능한 이점이 있다.
- [0073] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0074] <제조예>

[0075] **시약**

[0076] 하기 본 발명의 실험에서 사용된 시약은 다음과 같다. Cholesterol, cholesterol oxidase from Streptomyces sp., polyaniline (emeraldine base), glucose, uric acid, graphene oxide 및 Horseradish peroxidase (HRP)는 Sigma-Aldrich (Missouri, United States of America)로부터 구입하여 사용하였다. Sucrose, Triton X-100, 1M Tris HCl pH 8.0은 LPS solution(Daejeon, Republic of Korea)로부터, ascorbic acid, Isopropyl alcohol (IPA)은 DAEJUNG(Siheung-si, Republic of Korea)로부터, Bovine serum albumin (BSA)은 Bovogen Biologicals (Melbourne, Australia)로부터, agarose은 PhileKorea (Daejeon, Republic of Korea)로부터, 10 X Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)는 Welgene (Gyeongsan-si, Republic of Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 3,30,5,50-Tetramethylbenzidine (TMB) 기질 키트는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, United States of America)에서 입수하여 사용하였다. 탄소 전극은 (주)이지테크에이유(Bucheon-si, South Korea)에서 입수하여 사용하였다.

[0077] **<효소 고정화 전극의 제조>**

[0078] **① 작업 전극에서의 그래핀 고정화**

[0079] 먼저, 증류수로 세척(washing)을 마친 유리탄소전극(이하, GCE라 한다) 표면에 증류수로 희석시킨 100 μ L의 1 mg/mL 산화 그래핀(이하, GO라 한다)을 표면에 drop한 다음 순환 전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 진행하였다. 이때, 순환 전압전류법 측정 조건은 potential range: -1.5 V to +0.6 V, scan rate: 100 mV/s, cycles: 18의 조건으로 수행하였다.

[0080] 작업 전극에서의 그래핀 고정화를 확인하기 위해 순환 전압전류법을 측정하였다. 그 결과는 도 3과 같다.

[0081] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극에서 산화 그래핀(Graphene oxide, GO)의 전기분해에 따른 순환 전압전류법 그래프이다.

[0082] 도 3을 참조하면, 순환 전압전류법 측정이 진행되면서 산화환원 피크(redox peak)가 상승하고 아래에 있는 환원 피크는 점차 사라지는 것을 확인할 수 있으며, GCE의 작업 전극 상에 GO의 전기분해를 통해 그래핀이 전착된 그래핀층이 형성됨으로써, 전도성이 향상되는 것을 알 수 있다.

[0083] **② 그래핀층에서의 전도성 고분자 고정화**

[0084] 다음, 그래핀층에 1시간 동안 전도성 고분자를 상온의 온도 조건에서 고정하였다. 이때, 전도성 고분자는 LbL(layer-by-layer) 자가조립법을 이용하여 음전하를 띠는 그래핀과 양전하를 띠는 전도성 고분자가 서로 정전기적 인력을 통해 흡착되면서 전도성 고분자층이 형성된다.

[0085] **③ 전도성 고분자층에서의 산화효소 고정화**

[0086] 다음, 그래핀층 표면에 콜레스테롤 산화효소 ChOx를 20 μ L의 10 mg/dL 로 drop 한 다음 4° C의 온도에서 밤새 건조시켰다. 한편, ChOx의 고정화를 확인하기 위해 PANI와 ChOx의 pI(isoelectric point)값을 확인하였다. PANI의 pI value는 7.6이며 ChOx의 pI value는 4.4 내지 5.1이다. 즉, ChOx buffer의 pH를 8로 함으로써 PANI와 ChOx의 pI value가 8보다 낮아 둘 다 음전하를 띠게 되면서 PANI가 흡착된 전극 표면에 ChOx가 물리적 흡착으로 인해 고정되면서 효소층이 형성됨을 알 수 있다.

[0087] **<실시예 1>**

[0088] **최적의 화학적 고정화 조건 규명**

[0089] **<1-1> 최적의 전도성 고분자 종류 확립**

[0090] 본 출원의 발명자들은 그래핀층에 고정시킬 전도성 고분자의 최적화를 위하여 하기 [표 1]과 같은 실시예들을 제조하였다.

표 1

구분	전도성 고분자 종류
실시예 1-1	나피온(nafion)
실시예 1-2	PANI
실시예 1-3	폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)

- [0092] 최적의 전도성 고분자 종류를 확립하기 위한 실험은 다음과 같이 수행되었다.
- [0093] 전도성 고분자 중에서 나피온(nafion), PANI 및 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)을 선택하였으며, 그래핀층을 포함하는 전극을 준비하고 세 가지 고분자를 전극에 고정시킨 후 순환 전압전류법을 이용해 결과를 비교하였다. 이때, 전기화학 측정 조건은 potential range: -0.8 V to $+0.8\text{ V}$, scan rate: 100 mV/s 의 조건으로 수행하였다.
- [0094] 도 4의 (a) 내지 (c)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극에 고정화되는 전도성 고분자 최적화를 위한 나피온(nafion), PANI 및 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)의 순환 전압전류법 그래프들이다.
- [0095] 구체적으로, 도 4의 (a)는 전도성 고분자로 나피온을 사용하였으며, 도 4의 (b)는 전도성 고분자로 PANI를 사용하였으며, 도 4의 (c)는 전도성 고분자로 폴리에틸렌이민을 사용한 실험 결과에 대한 그래프이다.
- [0096] 도 4의 (a) 내지 (c)를 참조하면, PANI가 고정된 전도성 고분자층을 포함한 전극이 0.0 내지 0.5 V 사이에서 콜레스테롤 농도가 올라갈수록 피크(peak)가 상승한 것을 확인할 수 있다. PANI는 환경 안정성, 산화환원 특성 및 간단한 화학 반응으로 인해 전기 촉매 및 전기화학 센서 분야에서 가장 매력적인 전도성 고분자로 알려져 있다. 이로 인해 PANI가 콜레스테롤 전기화학 바이오센서에 가장 적합한 전도성 고분자임을 확인할 수 있다.
- [0097] **<1-2> 최적의 ChOx 농도 확립**
- [0098] 본 출원의 발명자들은 ChOx의 촉매 효율을 향상시키기 위하여 전도성 고분자층에 고정할 ChOx의 농도를 달리하여 하기 [표 2]와 같은 실시예들을 제조하였다.

표 2

구분	ChOx의 농도
실시예 2-1	$1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ChOx
실시예 2-2	$10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ChOx
실시예 2-3	$100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ChOx
실시예 2-4	$1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ ChOx

- [0100] 전도성 고분자층에 고정할 ChOx의 농도의 최적화 실험을 위하여 1 , 10 , 100 , $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 의 ChOx를 PBS(Phosphate-Buffered Saline)에 희석해 순환 전압전류법 측정을 수행하였다.
- [0101] 도 5의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극에 고정되는 산화효소 농도에 따른 콜레스테롤 농도별 피크 전류(peak current) 및 감도를 나타내는 그래프들이다.
- [0102] 도 5의 (a)를 참조하면, $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 및 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 인 ChOx를 전도성 고분자층에 고정하고 콜레스테롤의 농도별 센싱을 진행하였을 때, 농도별 피크 전류 값이 상승한 것을 확인할 수 있다. 도 5의 (b)를 참조하면, ChOx의 각 농도에서의 감도를 측정하였고, $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 에서 가장 높은 감도가 확인된 것을 알 수 있다. 이를 통해, ChOx의 농도는 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 일 때, 피크 전류 및 감도가 상승하는 것을 확인할 수 있다.
- [0103] **<1-3> 최적의 ChOx의 buffer pH확립**
- [0104] 본 출원의 발명자들은 ChOx의 촉매 효율을 향상시키기 위해 전도성 고분자층에 고정할 ChOx의 buffer pH를 달리하여 하기 [표 3]과 같은 실시예들을 제조하였다.

표 3

구분	ChOx의 buffer pH
실시예 3-1	buffer pH 5
실시예 3-2	buffer pH 6
실시예 3-3	buffer pH 7
실시예 3-4	buffer pH 8
실시예 3-5	buffer pH 9
실시예 3-6	buffer pH 10

[0106] 먼저, ChOx의 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 하고, ChOx의 buffer pH는 5 내지 10으로 준비된 전극에 고정된 다음 콜레스테롤을 센싱하여 전류 신호에 대한 pH의 영향을 조사하였다. 이론적으로, ChOx의 pI value인 4.4 내지 5.1보다 높고, PANI의 pI value인 7.6보다 높은 pH 8, 9, 10에서 음전하를 띠면서 PANI가 흡착된 전극 표면에 ChOx가 물리적 흡착으로 인해 고정되면서 효소층을 형성할 수 있다.

[0107] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극에 고정되는 산화효소의 buffer pH 별 감도를 나타내는 그래프이다.

[0108] 도 6을 참조하면, ChOx의 buffer가 8일 때, 가장 높은 감도가 확인된 것을 확인할 수 있다. 특히, ChOx의 최적 pH값인 pH 8은 인간 혈청의 pH값인 약 7.35에 매우 근접한 값이다. 이에, ChOx의 buffer가 8일때, 인간 혈청 내 콜레스테롤 검출에 유리할 수 있다.

[0109] <실시예 2>

[0110] 고정화 단계별 전기화학적 분석

[0111] 본 출원의 발명자들은 고정화 단계별 전기화학적 분석과 콜레스테롤 농도별 분석을 수행하기 위하여 GCE부터 ChOx가 고정된 전극까지 최적화된 조건으로 순환 전압전류법 측정을 수행하였다.

[0112] 본 실험의 순환 전압전류법 측정의 조건은 initial E: -0.8 V , step1 E: 0.8 V , Step2 E: -0.8 V . scanning direction: positive, scan rate: 100 mV/s , cycles: 3 이고, 3-전극 시스템을 사용하였으며, buffer는 1 M potassium chloride에 희석된 5 mM ferricyanide ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$)을 사용하였다.

[0113] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 고정화 단계별 순환 전류전압법 그래프이다.

[0114] 도 7을 참조하면, 작업 전극으로 이루어진 전극 보다 작업 전극 상에 전착된 그래핀층을 포함하는 전극의 산화 피크 전류가 더 높고, 그래핀층 상에 PANI가 고정된 전도성 고분자층을 포함하는 전극의 산화 피크 전류가 제일 높다는 것을 알 수 있다. 이는, 그래핀과 PANI로 인해 전도성이 좋아졌으며 이로 인해 전극의 전자 전달이 더 수월 해져 산화 피크 전류가 상승한 것을 의미한다. 한편, 전도성 고분자층 상에 ChOx가 고정된 효소층을 포함하는 전극의 산화 피크 전류는 낮아진 것을 확인할 수 있다. 이는, ChOx가 효소의 본성인 절연성을 띠기도 하며, 전극의 전자 전달을 방해하여 산화 피크 전류가 낮아진 것을 의미하므로, ChOx가 완벽하게 고정화 되었다는 것을 확인할 수 있다.

[0115] <실시예 3>

[0116] 콜레스테롤 농도별 전기화학적 분석

[0117] 상기 실시예에서 단계별 고정화가 완벽하게 진행되었음을 확인한 다음 콜레스테롤 농도별 순환 전류전압법을 측정하였다. 순환 전압전류법의 조건은 위와 동일하고, buffer는 1X PBS로 진행했다. 콜레스테롤의 농도를 달리하여 하기 [표 4]와 같은 실시예들을 제조하였다.

표 4

구분	콜레스테롤의 농도
실시예 4-1	0mg/dL
실시예 4-2	0.1mg/dL
실시예 4-3	0.3mg/dL
실시예 4-4	1mg/dL
실시예 4-5	3mg/dL
실시예 4-6	10mg/dL
실시예 4-7	30mg/dL
실시예 4-8	100mg/dL

[0119] 도 8의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 산화효소 개질 유무에 따른 콜레스테롤 농도별 순환 전류전압법 그래프들이다.

[0120] 구체적으로, 도 8의 (a)는 ChOx를 개질하지 않은 전극을 사용하여 콜레스테롤의 농도별로 순환 전압전류법을 측정한 그래프이고, 도 8의 (b)는 ChOx를 개질한 전극을 사용하여 콜레스테롤의 농도별로 순환 전압전류법을 측정

한 그래프이다.

[0121] 도 8의 (a) 및 (b)를 참조하면, ChOx를 개질한 전극을 사용하여 콜레스테롤을 농도별로 순환 전압전류법 측정을 하였을 때, 콜레스테롤 농도가 0.1 mg/dL에서 100 mg/dL로 증가함에 따라 산화 피크 전류의 증가가 뚜렷하게 관찰되는 것을 확인할 수 있다.

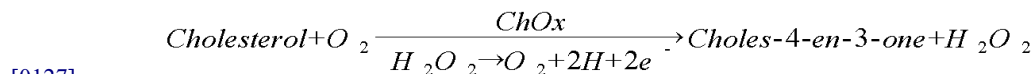
[0122] 도 9의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 산화효소 개질 유무에 따른 콜레스테롤 농도별 피크 전류(peak current) 그래프들이다.

[0123] 구체적으로, 도 9의 (a)는 ChOx를 개질하지 않은 전극을 사용하여 콜레스테롤의 농도별로 피크 전류를 측정한 그래프이고, 도 9의 (b)는 ChOx를 개질한 전극을 사용하여 콜레스테롤의 농도별로 피크 전류를 측정한 그래프이다.

[0124] 도 9의 (a)을 참조하면, 콜레스테롤을 4-cholestene-3-one와 과산화수소로 촉매하는 ChOx가 존재하지 않으므로, 산화 환원 피크 전류가 생기지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면, 도 9의 (b)를 참조하면, 콜레스테롤을 4-cholestene-3-one와 과산화수소로 촉매하는 ChOx가 존재하므로, 콜레스테롤 농도가 0.1 mg/dL에서 100 mg/dL로 증가함에 따라 산화 피크 전류의 증가가 뚜렷하게 관찰되는 것을 확인할 수 있다.

[0125] 한편, 양전위에서의 전류의 반응 증가는 생성된 과산화수소의 산화에서 비롯되고, 음전위에서의 전류의 감소는 산소의 소비에서 비롯된다. 생성된 과산화수소의 감소는 음의 전위에서 전류의 증가를 초래하지만, 산소의 소비로 인해 완전히 상쇄될 것이다. 이 반응에서 발생한 전자는 산화환원 프로브를 통해 전극으로 전달되어 전류 형태의 신호를 생성한다.

[0126] [화학식 1]



[0127]

[0128] 상기 [화학식1]을 통해 알 수 있듯이, 콜레스테롤의 농도가 높다면 생성되는 과산화수소가 많아지고 이로 인해 생성된 수소와 산소, 전자 또한 많아지므로 높은 전류값이 측정될 수 있다. 즉, 0.1 mg/dL 내지 100 mg/dL의 콜레스테롤이 성공적으로 측정이 가능한 가운데 간질액(interstitial fluid, ISF)에 존재하는 콜레스테롤의 농도는 24 mg/dL 내지 48 mg/dL이므로, 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤 전기화학 바이오센서는 간질액에 존재하는 콜레스테롤의 진단이 적합한 바이오센서인 것을 확인할 수 있다.

[0129] <실시예 3>

[0130] 콜레스테롤 정량화를 위한 활성도 테스트

[0131] 본 출원의 발명자들은 콜레스테롤 정량화를 위해 ChOx와 겨자무과산화효소(Horseradish peroxidase, HRP)를 사용하여 광학밀도를 측정하여 활성도 테스트를 진행하였다.

[0132] 도 10은 콜레스테롤 산화효소(Cholesterol Oxidase, ChOx) 및 겨자무과산화효소(Horseradish peroxidase, HRP)의 농도별 비색 효소 분석(colorimetric enzymatic assay)에 대한 그래프이다.

[0133] 도 10을 참조하면, ChOx 및 겨자무과산화효소(이하, HRP라 한다)가 10 µg/mL일 때, 가장 높은 흡광도를 갖는 것을 확인할 수 있다. 이때, 흡광도가 높다는 것은 입사한 빛보다 투과한 빛의 세기가 작다는 뜻이다. 즉, ChOx 및 HRP가 10 µg/mL일 때, 많은 양의 choles-4-en-3-one과 과산화수소가 생성되어서 투과한 빛의 세기가 작아진 것이므로, ChOx와 콜레스테롤 기질(substrate)이 정상적으로 효소 반응(enzymatic reaction)이 진행된 것을 확인할 수 있다.

[0134] <실시예 4>

[0135] 고정화 단계별 형태학적 분석 및 성분 분석

[0136] 본 출원의 발명자들은 GCE부터 그래핀, PANI 및 ChOx의 고정화 단계별로 형태학적 분석을 수행하기 위해 SEM(Scanning electron microscope)을 사용하여 미세구조를 확인하였으며, 고정화 단계별로 성분 분석을 하기 위해 주사전자현미경을 사용하여 EDS(Energy-dispersive X-ray spectroscopy) 분석을 진행하였다.

[0137] 도 11의 (a) 내지 (d)는 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극의 고정화 단계별 SEM(Scanning electron microscope) 이미지들이다.

[0138] 구체적으로, 도 11의 (a)는 GCE의 작업 전극 이미지이며, 도 11의 (b)는 작업 전극 상에 전착된 그래핀층 이미지이며, 도 11의 (c)는 그래핀층 상에 전도성 고분자가 흡착되어 고정된 전도성 고분자층 이미지이며, 도 11의 (d)는 전도성 고분자층 상에 산화효소가 고정화된 효소층 이미지이다.

[0139] 도 11의 (a) 내지 (d)를 참조하면, 작업 전극 이미지는 별다른 응집체(aggregate) 없이 평평한 것을 확인할 수 있으며, 그래핀층 이미지는 GO에 의한 전기분해로 인해 무작위로 구겨지고 접힌 시트(sheet)가 발견된 것을 확인할 수 있다. 전도성 고분자층 이미지는 서로 얹힌 응집체로 이루어진 비정질 구조(amorphous structure)를 확인할 수 있으며, 효소층 이미지는 ChOx가 PANI의 응집체 사이를 채워 응집체의 수가 줄어든 것을 확인할 수 있다. 즉, SEM 이미지 분석 결과를 통해 고정화 단계별로 전극이 완벽하게 개질된 것을 확인할 수 있다.

[0140] 하기 [표 5]는 고정화 단계별 성분 분석을 하기 위해 SEM을 사용하여 EDS 분석한 결과이다.

표 5

sample	탄소(Carbon)	질소(Nitrogen)	산소(Oxygen)	불순물(Au ₂ O ₃)
작업 전극	86.51%			13.49%
그래핀층	78.24%		21.76%	
전도성 고분자층	58.71%	30.45%		10.84%
효소층	76.88%	23.12%		

[0142] 상기 [표 5]를 참조하면, 탄소로 구성되어 있는 작업 전극은 86.51%의 탄소와 불순물인 13.49%의 Au₂O₃ 이 관찰된 것을 알 수 있다. 그래핀층은 GO의 전기분해에 의하여 78.24%의 탄소와 21.76%의 산소가 관찰되었다. 다음 PANI를 고정화한 전도성 고분자층은 58.71%의 탄소, 30.45%의 질소와 10.84%의 Au₂O₃ 이 관찰되었으며, 이를 통해 PANI는 탄소와 질소로 구성되어 있다고 볼 수 있다. 마지막으로, ChOx를 고정화한 효소층은 76.88%의 탄소와 23.12%의 질소의 검출된 것을 알 수 있다. 즉, EDS 결과를 통해 고정화 단계별로 전극이 완벽하게 개질된 것을 알 수 있다.

[0143] 한편, 마이크로니들을 사용하여 사람 피부 모델에서 콜레스테롤을 추출하도록 실험을 수행하였다.

[0144] 추출된 콜레스테롤은 본 연구에서 설명했듯이 최적화된 조건으로 제작된 전극을 사용하여 순환 전압전류법을 측정하였다. 순환 전압전류법은 initial E: -0.8 V, step1 E: 0.8 V, Step2 E: -0.8 V. scanning direction: positive, scan rate: 100 mV/s, cycles: 3의 조건으로 수행하였다.

[0145] <실험예 1. 마이크로니들을 사용한 콜레스테롤의 전기화학적 측정>

[0146] <실험방법>

[0147] ① 콜레스테롤 준비

[0148] 콜레스테롤은 0.01 g의 콜레스테롤 파우더 (Sigma Aldrich)을 0.2 mL Isopropanol과 0.2 mL TritonX-100에 용해하고 침전이 없을 때까지 95° C로 가열하였다. 그 다음 혼합 용액을 1.6 mL의 1X PBS에 다시 희석시켜 4° C에 보관하여 후후 사용하였다. 이 stock 콜레스테롤 용액은 5 mg/mL으로 다른 농도의 콜레스테롤은 표준 원액으로 준비되었다.

[0149] ② 콜레스테롤 추출

[0150] 사람 피부 모델을 대신할 아가로스 겔(agarose gel) 및 돼지 피부를 콜레스테롤에 하루 동안 담가 두었다. 콜레스테롤의 농도는 15, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 mg/dL를 사용하였다. 하루가 지나면 콜레스테롤을 흡수한 아가로스 겔 및 돼지 피부에 파라필름을 덮은 후 마이크로니들로 10분간 로딩(loading)하였다. 1 mL의 증류수가 들어있는 마이크로튜브에 로딩한 PAAM MN을 넣고, 15분 동안 원심 분리기(centrifuge)를 사용하여 콜레스테롤을 추출하였다. 추출한 콜레스테롤은 1 mL의 증류수로 인해 희석이 되었으며, 추출한 콜레스테롤의 농도를 알기 위하여 하기 [수학식 1]에 기초하여 추출한 콜레스테롤의 농도를 계산하였다.

[0151] [수학식 1]

$$C_d = \frac{C_k \times V}{(W_t - W_o) / \rho}$$

[0152]

- [0153] 여기서 C_d 는 마이크로니들 상 실제 콜레스테롤의 양을 의미하고, C_k 는 증류수 상 콜레스테롤의 양을 의미하고, V 는 증류수의 양(mL)을 의미하고, ρ 는 콜레스테롤의 밀도(1g/mL)를 의미하고, W_0 는 추출 전 건조된 마이크로니들의 무게(g)를 의미하고, W_t 는 추출 후 마이크로니들의 무게(g)를 의미한다.
- [0154] ③ 마이크로니들에서 추출한 콜레스테롤을 순환 전압전류법 측정
- [0155] 마이크로니들에서 추출한 콜레스테롤을 순환 전압전류법을 측정하였다 이후, 센싱된 결과를 피크 전류로 정리하여 준비된 standard curve(exponential analysis)에 대입을 하여 C_k 의 예측이 가능하다.
- [0156] 도 12의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로니들을 통해 아가로즈 겔에서 추출한 콜레스테롤의 농도별 피크 전류(peak current) 및 실제 콜레스테롤 농도와 계산된 C_d 의 선형 상관(linear correlation)에 대한 그래프들이다.
- [0157] 도 12의 (a) 및 (b)를 참조하면, 0.1 mg/dL와 1 mg/dL사이 MN 15 mg/dL와 MN 30 mg/dL가 존재하고, 1 mg/dL와 10 mg/dL사이 MN 50, 100, 150, 200, 250 mg/dL가 존재하며 MN 300mg/dL와 10 mg/dL가 거의 비슷하다는 것을 확인할 수 있다. 이에, 알아낸 C_k 를 통해 [수학식 1]에 대입하면 C_d 값을 계산할 수 있다. 즉, 아가로즈 겔에 넣어둔 콜레스테롤 농도와 C_d 값을 비교했을 때 100% $\pm$ 2% 정도의 정확도를 도출한 것을 확인할 수 있다.
- [0158] 도 13의 (a) 및 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로니들을 통해 돼지 피부에서 추출한 콜레스테롤의 농도별 피크 전류(peak current) 및 실제 콜레스테롤 농도와 계산된 C_d 의 선형 상관(linear correlation)에 대한 그래프들이다.
- [0159] 도 13의 (a) 및 (b)를 참조하면, 돼지 피부를 사용했을 때 역시 아가로즈 겔을 사용했을 때의 결과와 동일한 것을 확인할 수 있다. 또한, 실제 콜레스테롤 농도와 돼지 피부의 C_d 값을 비교했을 때 100% $\pm$ 2%정도의 정확도를 도출한 것을 알 수 있다.
- [0160] 즉, 아가로즈 겔 및 돼지 피부에서 마이크로니들을 사용하여 콜레스테롤 추출이 가능하고, [수학식 1]을 통해 회석된 콜레스테롤의 농도 역시 계산이 가능하다. 또한, 실제 콜레스테롤 농도와 계산된 C_d 값과 거의 동일하다는 것을 보아 제작된 전극이 정상적으로 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 역할을 한다는 것을 알 수 있다.
- [0161] <실험예 2. 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 재현성(reproducibility) 테스트>
- [0162] <실험방법>
- [0163] 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 재현성을 확인하기 위하여 8개의 전극을 준비한 다음 0 내지 14일 후, 100 mg/dL의 콜레스테롤이 존재하는 조건 하에 순환 전압전류법 측정을 수행하였다. 한편, 순환 전압전류법을 측정하기 전 사용하지 않은 전극들은 4° C의 온도에서 보관하였다.
- [0164] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 재현성(reproducibility) 테스트 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0165] 도 14를 참조하면, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14일에 측정한 전극의 민감도가 거의 일정한 것을 확인할 수 있다. 한편, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14일에 측정한 전극을 3번 측정하였을 때 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)가 3.79%로 낮게 측정된 것을 알 수 있으며, 본 연구에서 제안된 콜레스테롤 전기화학 바이오센서는 4° C의 온도에서 보관하는 조건 하에 14일 이내에 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있다.
- [0166] <실험예 3. 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 간섭 물질(interference) 분석>
- [0167] <실험방법>
- [0168] 0.05 μ M의 포도당(glucose), 아스코브르산(ascorbic acid), 요산(uric acid), 스쿠로스(sucrose) 및 소 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)을 간섭 물질로 사용하여 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 간섭 물질 분석을 수행하였다.
- [0169] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤 전기화학 바이오센서의 간섭 물질(interference) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0170] 도 15를 참조하면, 1 mg/dL 콜레스테롤의 피크 전류와 간섭 물질들의 피크 전류의 차이가 미세한 것을 확인할

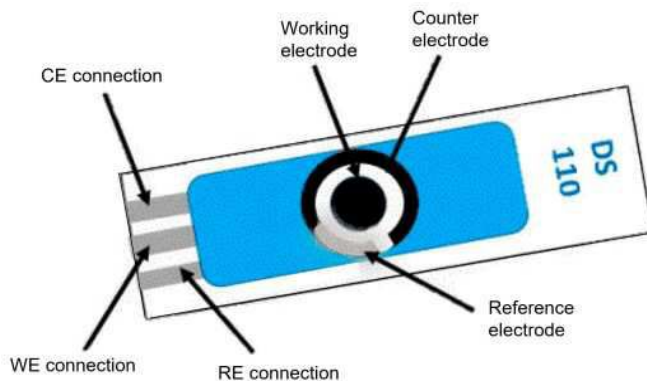
수 있다. 또한, 10 mg/dL 콜레스테롤과 큰 차이의 피크 전류를 보여주며 간섭 물질의 간섭 반응이 없다는 것을 알 수 있다. 한편, 전극을 3번 측정하였을 때 표준편차는 1.44%로 측정되었다. 이를 통해 제작한 콜레스테롤 전기화학 바이오센서는 콜레스테롤 외의 물질들의 반응이 존재하지 않으므로, 체액에서 콜레스테롤의 선택적인 측정이 가능한 것을 확인할 수 있다.

[0171] 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 고정화 전극은 GCE의 작업 전극에 그래핀, PANI 및 ChOx가 단계별로 고정될 수 있다. 이에, 작업 전극에 산화 그래핀이 화학적으로 환원되면서 발생한 그래핀이 전착됨으로써, 전자 전달의 효율이 증가할 수 있다. 또한, 그래핀층에 양전하를 띠는 PANI가 음전하를 띠는 그래핀과 서로 정전기적 인력에 의해 고정됨으로써, 이후 고정화될 ChOx의 고정화를 더욱 견고하게 할 수 있다. 특히, ChOx buffer의 pH를 8로 함으로써, PANI와 ChOx가 둘 다 음전하를 띠게 되면서 PANI가 흡착된 전극 표면에 ChOx가 물리적 흡착으로 인해 고정될 수 있다. 이를 통하여 PANI까지 고정된 효소 고정화 전극에서 ChOx의 고정화 효율을 증가시킨 효소층을 형성할 수 있다. 이에, 최종적으로 상술한 효소 고정화 전극을 포함한 전기화학 바이오센서는 검출되는 콜레스테롤의 검출 감도가 향상될 수 있다.

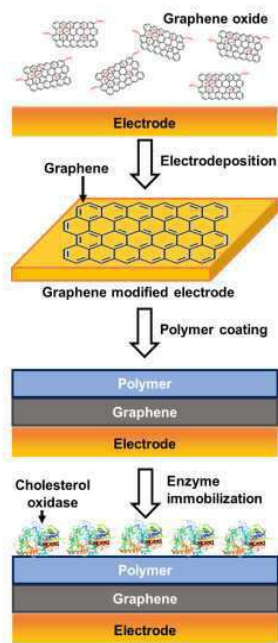
[0172] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

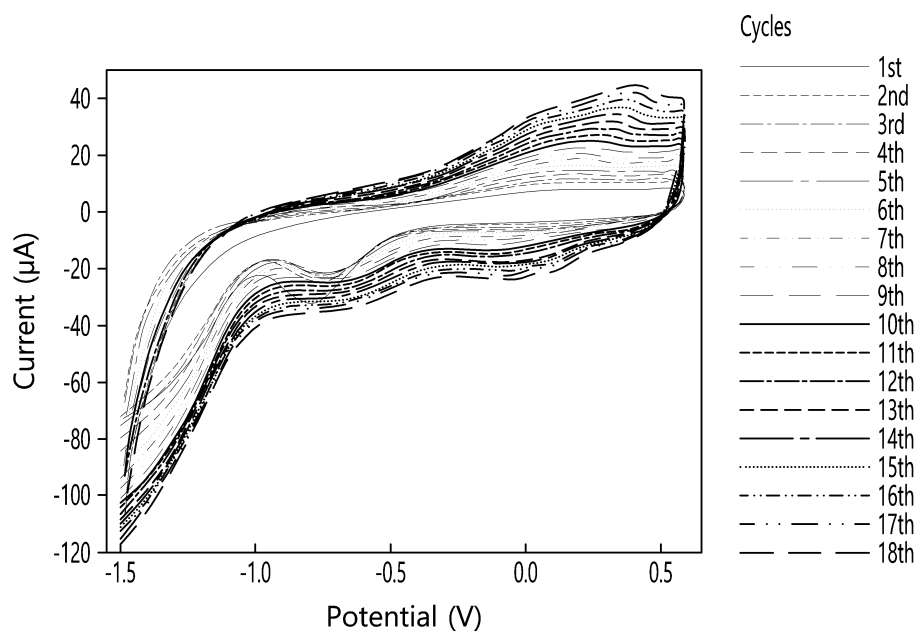
도면1



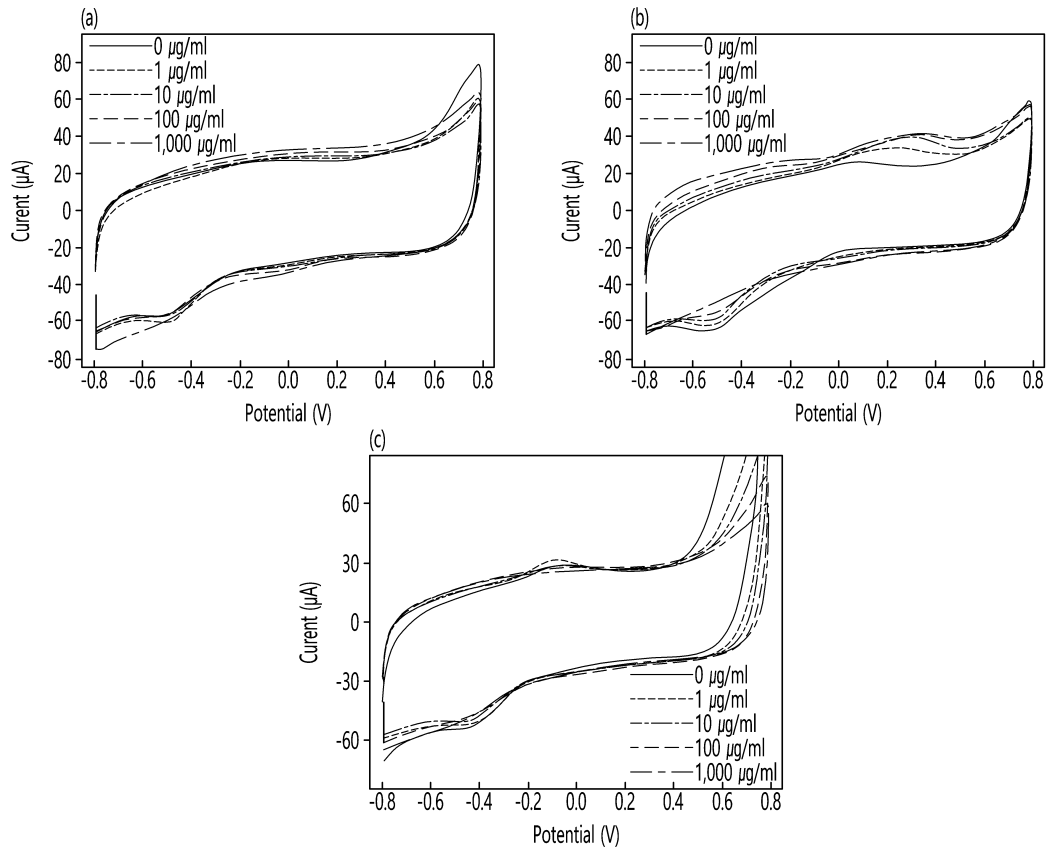
도면2



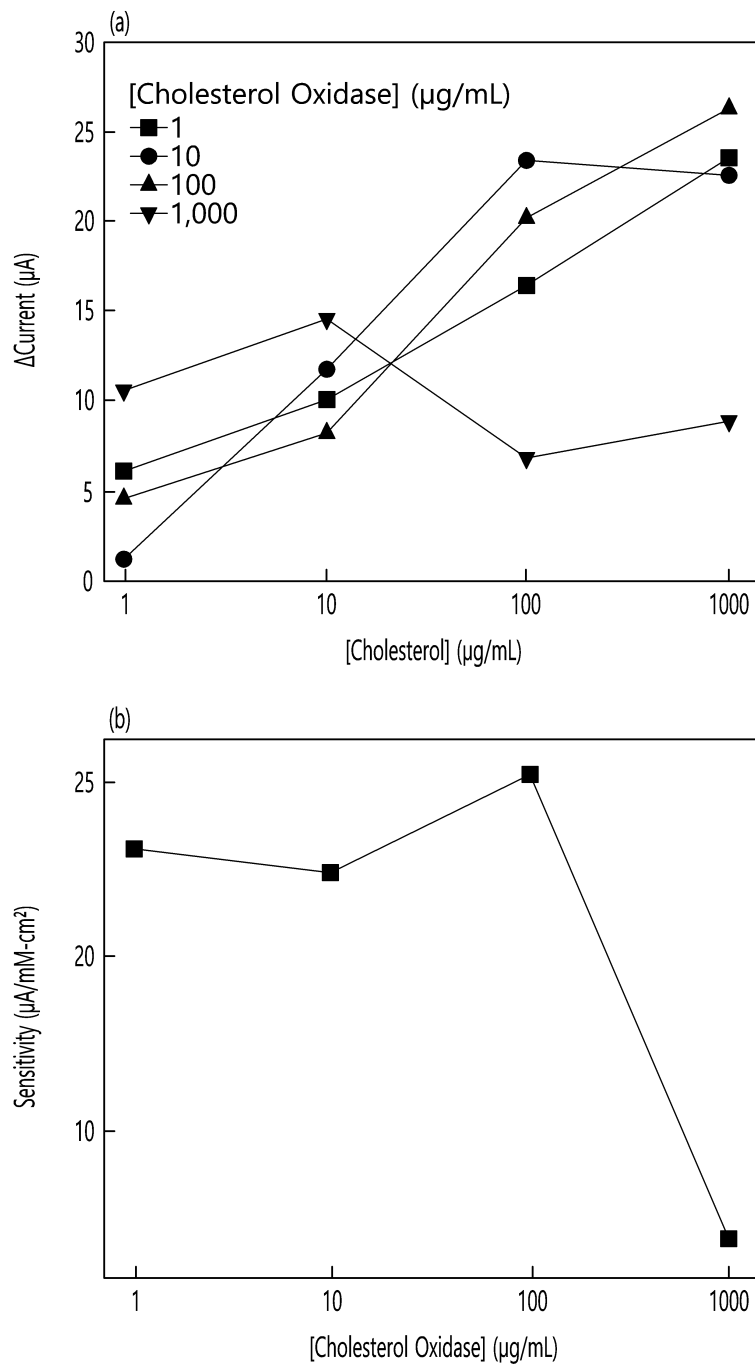
도면3



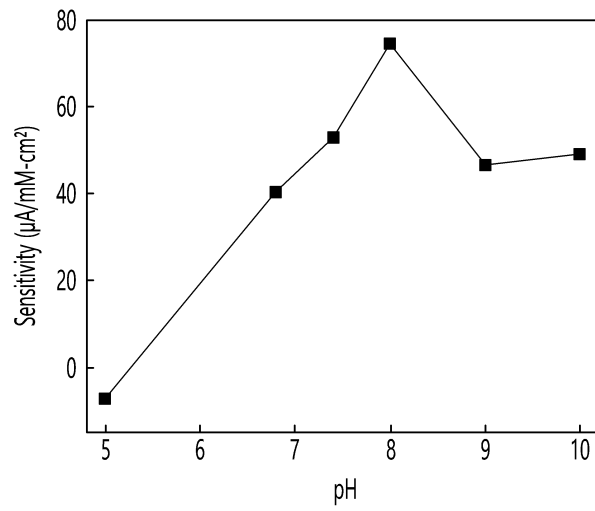
도면4



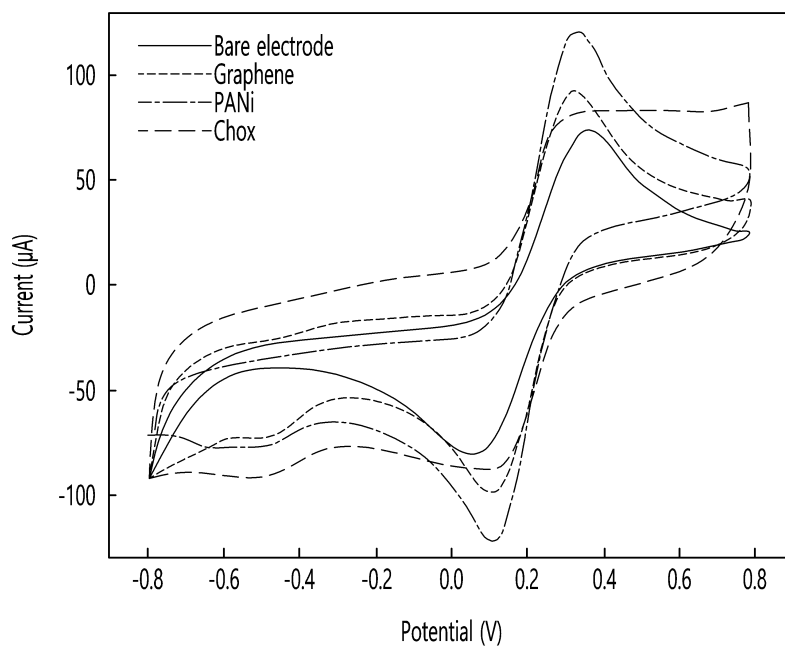
도면5



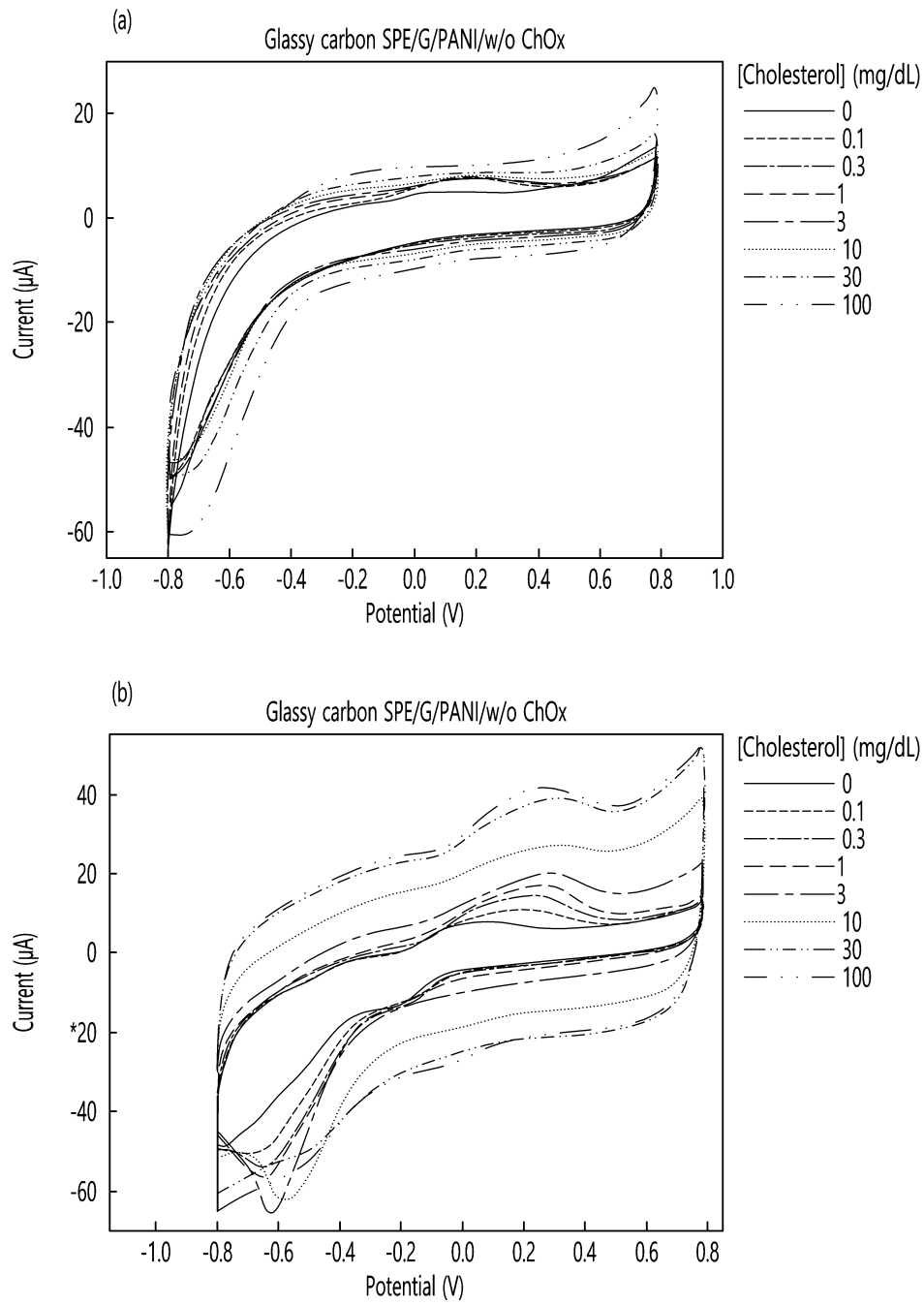
도면6



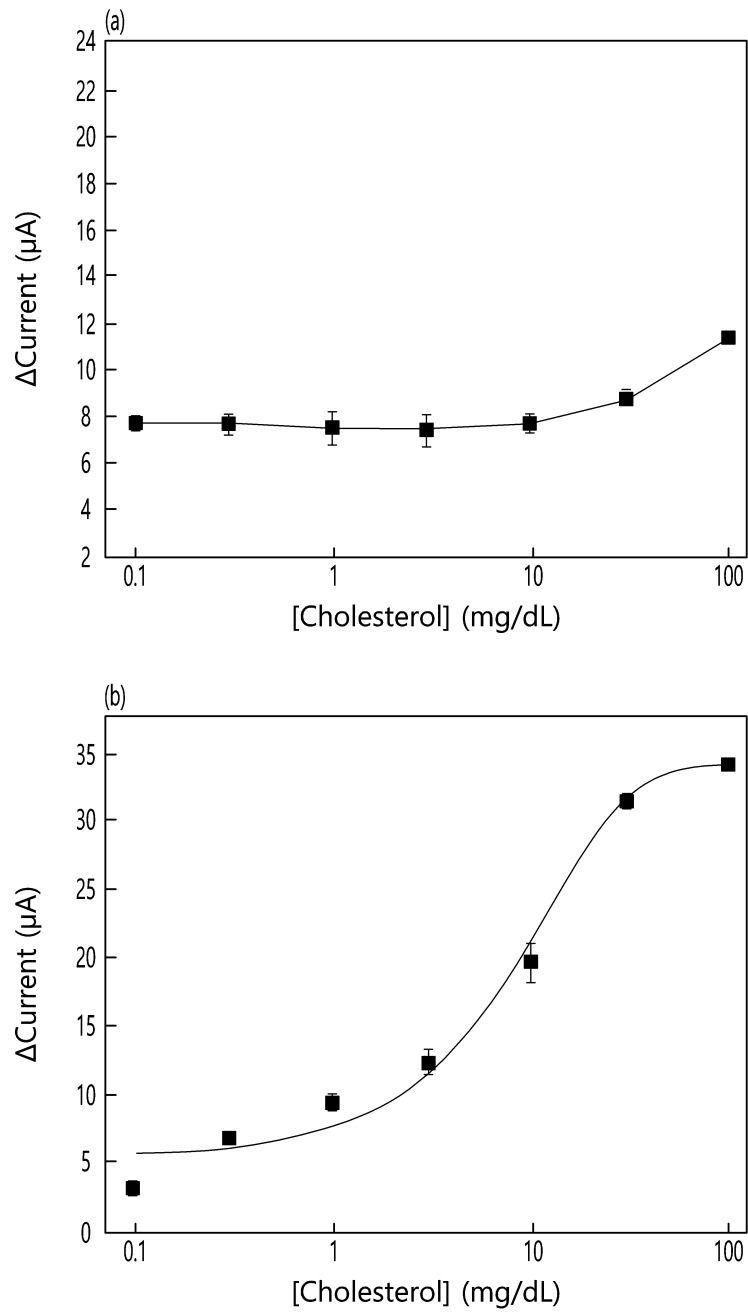
도면7



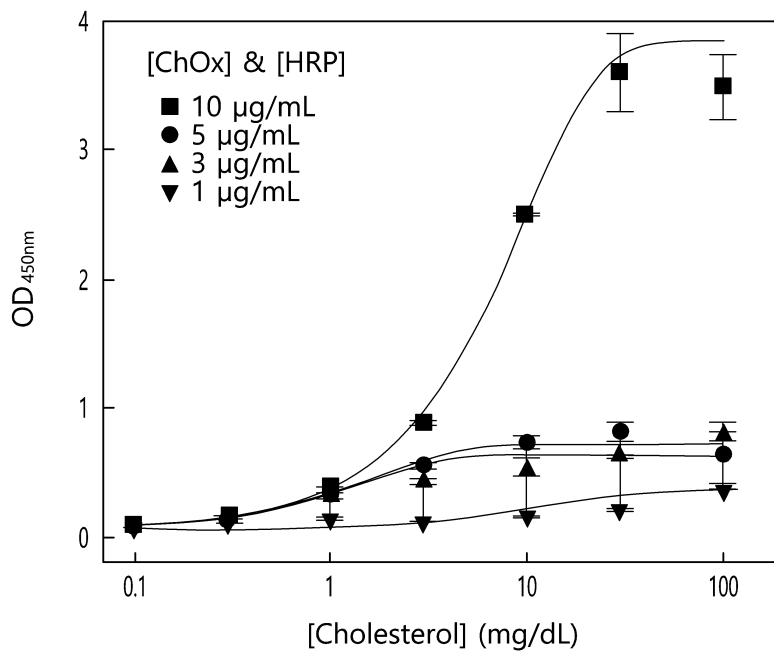
도면8



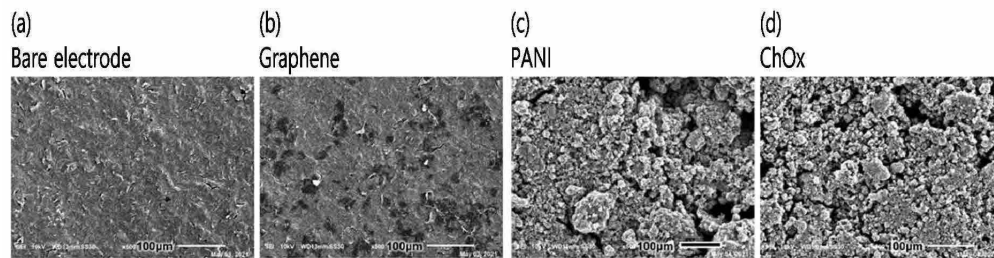
도면9



도면10

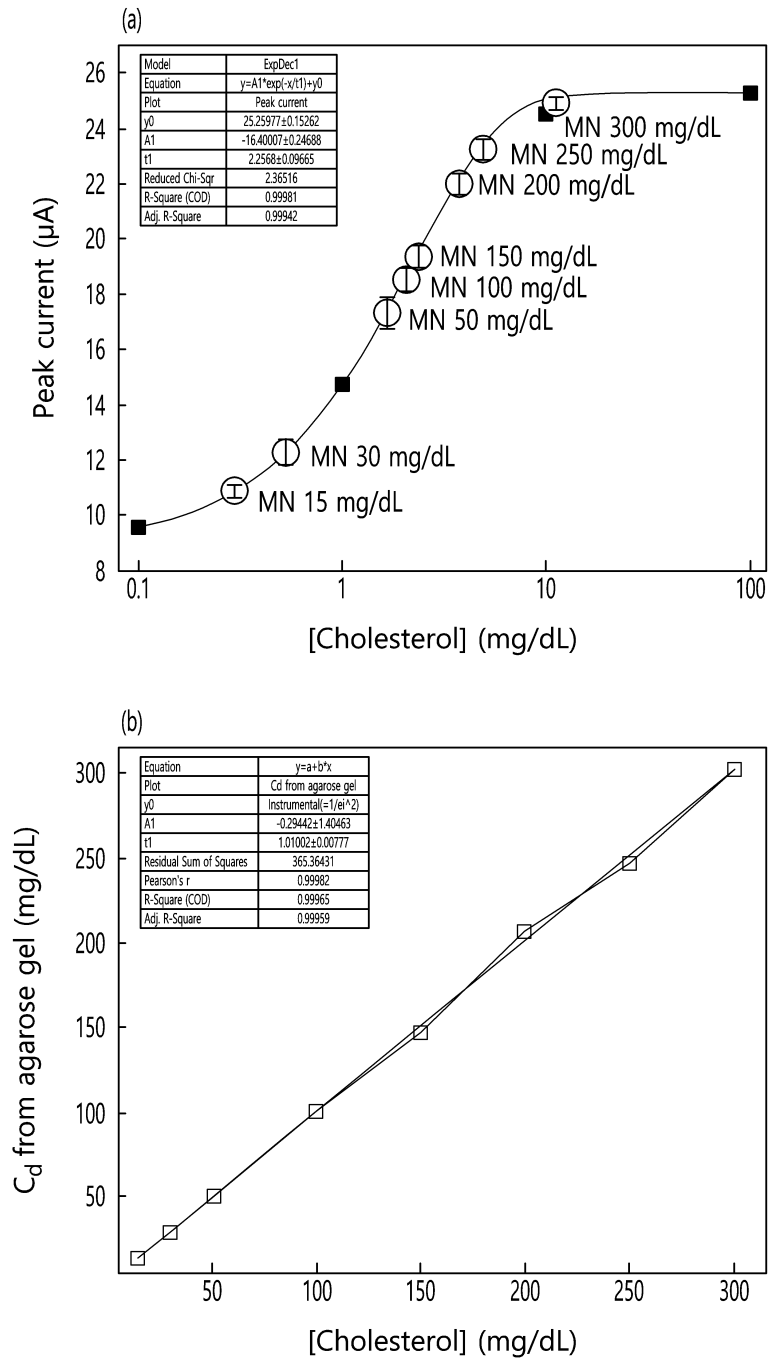


도면11

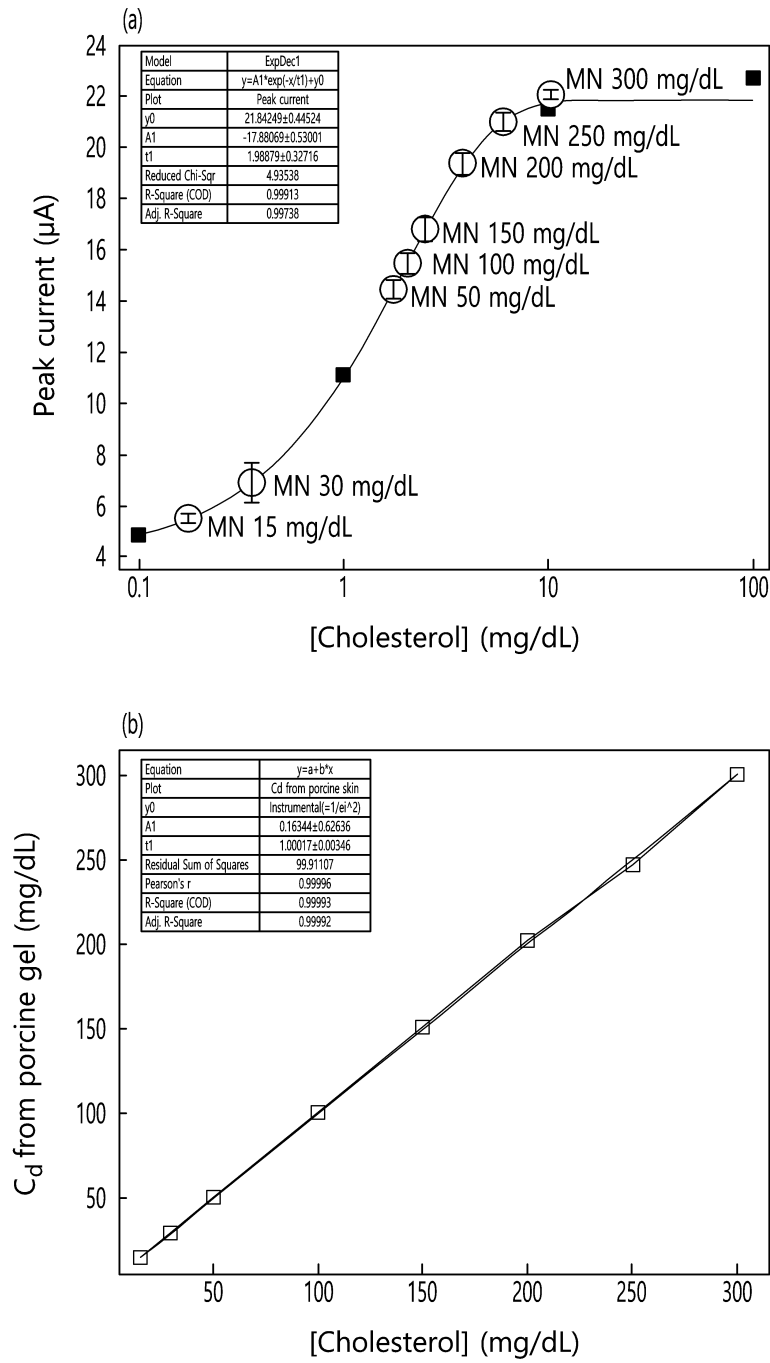


X500

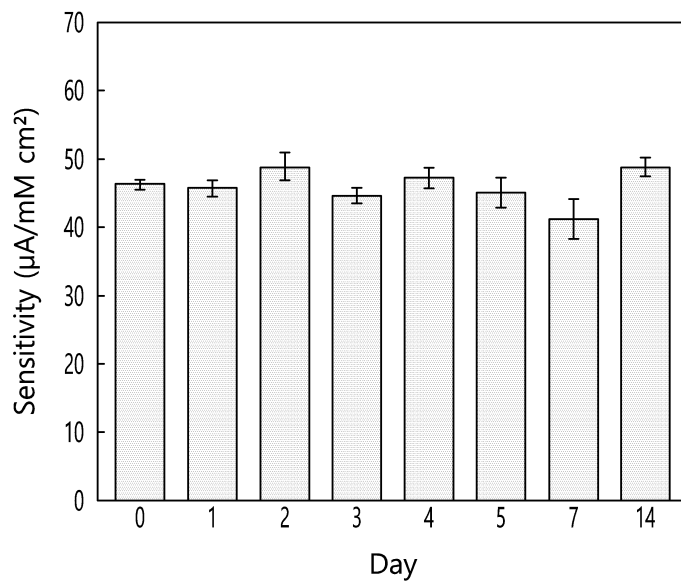
도면12



도면13



도면14



도면15

