



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0107963
(43) 공개일자 2010년10월06일

(51) Int. Cl.

G01N 27/30 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0026361

(22) 출원일자 2009년03월27일

심사청구일자 2009년03월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

송민정

서울특별시 영등포구 대림2동 1076-4호 19층 1반

황성우

서울특별시 강남구 대치동 511 한보미도맨션
105-1407

황동목

서울특별시 송파구 가락2동 극동아파트 4동 106호

(74) 대리인

특허법인충현

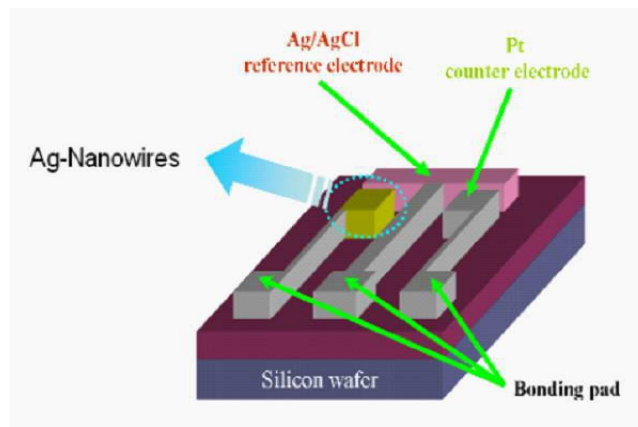
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 은나노선을 이용한 과산화수소 검출용 바이오센서 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 과산화수소 검출용 바이오센서 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 기준 전극, 작업 전극, 상대 전극을 포함하는 과산화수소 검출용 바이오센서로서, 상기 작업 전극은 은나노선(Ag-Nanowires)을 포함하는 것을 특징으로 하며, 이에 따라 작업 전극의 면적을 극대화되어 감응 속도가 빠르고, 저농도의 과산화수소까지 검출할 수 있는 고감도 과산화수소 검출용 바이오센서를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

기준 전극, 작업 전극, 상대 전극을 포함하는 과산화수소 검출용 바이오센서로서, 상기 작업 전극은 은나노선(Ag-Nanowires)을 포함하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 작업 전극은 은나노선층으로 코팅된 금(Au) 전극인 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 작업 전극은 은나노선층 상부에 시스테인층을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 시스테인은 글루타알데히드와 결합되어 있고, 상기 글루타알데히드는 효소와 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 시스테인과 글루타알데히드의 결합 및 글루타알데히드와 효소의 결합은 이미드 결합인 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 기준 전극은 Ag/AgCl 기준 전극인 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 상대 전극은 백금 상대 전극인 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서.

청구항 8

금(Au) 전극위에 은나노선층을 형성하는 단계;

상기 은나노선층이 형성된 금(Au) 전극을 시스테인 용액 중에 담금으로써 은나노선층상에 시스테인층을 형성하는 단계;

상기 시스테인층이 형성된 전극의 표면을 글루타알데히드 용액에 노출시킴으로써 시스테인과 글루타알데히드를 결합시키는 단계;

상기 글루타알데히드 처리된 전극을 효소를 함유하는 용액에 담금으로써 효소를 상기 전극에 결합시키는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서의 작업 전극을 제조하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 금(Au) 전극위에 은나노선층을 형성하는 단계는 은나노선을 함유하는 용액을 금(Au) 전극 위에 떨어뜨린 후 건조시키는 과정을 반복함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서의 작업 전극을 제조하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 은나노선은 Pt 시드 및 PVP의 존재하에 에틸렌글리콜을 이용하여 AgNO_3 를 환원시키는 방법으로 형성되는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출 센서의 작업 전극을 제조하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고감도 과산화수소 검출용 바이오센서 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 작업 전극의 면적을 극대화되어 감응 속도가 빠르고, 저농도의 과산화수소까지 검출할 수 있는 고감도 과산화수소 검출용 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 과산화수소(H_2O_2)는 강한 산화성을 가지며, 이러한 특성상 여러 분야에서 널리 사용되고 있다. 예를 들어, H_2O_2 는 유기 화합물 합성, 식품 제조, 펄프 및 제지 표백 및 의료 분야에서 다양하게 사용된다. 또한 H_2O_2 는 연료 전지용 산화제로도 사용할 수 있으며, 화장품이나 의약품 등의 여러 시판 제품에도 광범위하게 사용되고 있다. 그 외에도 H_2O_2 는 최근 바이오센서 분야에서 효소 반응의 중요한 부산물로 주목받고 있다. 이와 같이 H_2O_2 의 검출 및 정량화는 여러 분야에서 그 필요성이 상당히 크다.

[0003] 바이오센서는 특정 물질과 반응할 수 있는 물질을 전극 표면에 고정화하여 이를 전기적 신호로 바꿔 그의 성분이나 정량 분석하는 시스템이다. 이러한 바이오센서에 있어서, 전극 표면에 고정화되는 반응 관련 물질의 양은 바이오센서의 감도에 영향을 미치는 중요한 요인들 중 하나이다. 그러나 최근 들어 바이오센서가 점차 소형화되어짐에 따라 특정 물질과 반응할 수 있는 물질들을 고정화할 수 있는 면적도 작아지면서 고감도의 소형화 센서 개발의 심각한 한계가 나타나고 있다.

[0004] 이런 한계를 극복하기 위해, 나노 기술을 접목한 센서들이 개발되고 있는데, 이런 센서들 중 하나가 나노선을 이용한 것이다. 그러나 기존의 나노선들은 대부분 반도체를 이용한 것으로 고온, 고압 하에서 고가의 장비를 이용하여 합성되어야 하며, 또한 기존의 나노 입자를 이용한 대부분의 경우 바이오물질의 흡착을 이용하여 고정화함으로써 이들의 변성 및 배향성으로 인한 직접적인 전자 전달 방해의 문제가 있었다.

[0005] 한편 본 발명자는 특허등록 제10-729147호(등록일 2007. 6. 11)에서 고감도 바이오센서 및 이를 포함하는 복합 바이오센서에 관한 발명을 공개한 바 있다. 상기 발명은 본 발명과 같이 기준 전극, 상대 전극 및 작업 전극을 포함하며, 작업 전극의 상부에 효소고정부를 포함하는 바이오센서에 관한 것으로서, 작업 전극부를 복수개의 요철 형상으로 구성하여 표면적을 증가시킨 것이 특징이다.

[0006] 그러나 상기 방법으로는 작업 전극의 표면적과 감도에 한계가 있어, 본 발명자는 작업 전극부에 새로운 물질을 도입함으로써 유효 작업 면적을 극대화시킬 수 있는 방법을 개발하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 작업 전극의 면적을 극대화하여 감응 속도가 빠르고, 저농도의 과산화수소까지 검출이 가능한 고감도의 과산화수소 검출용 바이오센서를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 상기 과산화수소 검출용 바이오센서의 작업 전극을 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0009] 상기 첫 번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 기준 전극, 작업 전극, 상대 전극을 포함하는 과산화수소 검출용 바이오센서로서, 상기 작업 전극은 은나노선(Ag-Nanowires)을 포함하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서를 제공한다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 의하면, 상기 작업 전극은 은나노선층으로 코팅된 금(Au) 전극인 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서를 제공한다.

[0011] 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, 상기 작업 전극은 은나노선층 상부에 시스테인(cysteamine)층을 더 포함

하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서를 제공한다. 또한 상기 시스테아민은 글루타알데히드 (glutaldehyde)와 결합되어 있을 수 있으며, 상기 글루타알데히드는 효소와 결합되어 있는 수 있다. 이때, 상기 시스테아민과 글루타알데히드의 결합 및 글루타알데히드와 효소의 결합은 이미드(imide) 결합인 것이 바람직하다.

[0012] 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, 상기 기준 전극은 Ag/AgCl 기준 전극인 것이 바람직하고, 상기 상대 전극은 백금 상대 전극인 것이 바람직하다.

[0013] 상기 두 번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 금(Au) 전극위에 은나노선층을 형성하는 단계; 상기 은나노선층이 형성된 금(Au) 전극을 시스테아민 용액 중에 담금으로써 은나노선층상에 시스테아민층을 형성하는 단계; 상기 시스테아민층이 형성된 전극의 표면을 글루타알데히드 용액에 노출시킴으로써 시스테아민과 글루타알데히드를 결합시키는 단계; 상기 글루타알데히드 처리된 전극을 효소를 함유하는 용액에 담금으로써 효소를 상기 전극에 결합시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 바이오센서의 작업 전극을 제조하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 의하면, 상기 금(Au) 전극위에 은나노선층을 형성하는 단계는 은나노선을 함유하는 용액을 금(Au) 전극위에 떨어뜨린 후 건조시키는 과정을 반복함으로써 수행할 수 있다.

[0015] 또한 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, 상기 은나노선은 Pt 시드 및 PVP의 존재하에 에틸렌글리콜을 이용하여 AgNO₃를 환원시키는 방법으로 형성할 수 있다.

효과

[0016] 본 발명은 과산화수소 검출용 바이오센서의 작업 전극에 은나노선을 도입함으로써 유효 전극 면적을 증가시켜, 10초 이내의 빠른 감응 속도와 낮은 농도 구간까지의 과산화수소 검출이 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 빠른 감응시간을 갖는 초고감도 바이오센서로서, 나노테크놀로지와 바이오테크놀로지가 접목된 것이 특징이다. 먼저 센서의 소형화에 따른 작업 전극 부분의 면적 증가를 위해 금 박막 위에 은나노선을 분산시켜 그 면적을 극대화시켰다. 은나노선은 전도성이 우수하고 금속들 중 접촉 저항이 가장 낮아 직접적인 전자전달이 가능하기에 과산화수소 분해 촉매로 높은 촉매 감응을 보인다. 뿐만 아니라 나노입자 구조에 비하여 전극 면적이 넓기 때문에 효소 결합을 위한 더 많은 결합 사이트를 제공한다. 이렇게 준비된 전극 위에 바이오물질인 효소들은 공유결합인 자기조립단분자막을 이용하여 고정화함으로써 효소들의 변성을 막고 안정성과 배향성을 증가시켰다. 이에 따라 빠른 감응 속도와 저농도까지 감지할 수 있는 고감도의 바이오센서를 제공할 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 과산화수소 검출용 바이오센서는 기준 전극, 작업 전극, 상대 전극을 포함하는 과산화수소 검출 센서로서, 상기 작업 전극은 은나노선(Ag-Nanowires)을 포함하는 것이 특징이다.

[0019] 본 발명의 일구현예에 의하면, 상기 작업 전극은 은나노선층으로 코팅된 금(Au) 전극이 바람직하다.

[0020] 또한 본 발명의 다른 일구현예에 의하면, 상기 작업 전극은 은나노선층 상부에 시스테아민층을 더 포함할 수 있으며, 상기 시스테아민은 글루타알데히드와 결합되어 있을 수 있으며, 상기 글루타알데히드는 효소와 결합되어 있을 수 있다. 이때, 상기 시스테아민과 글루타알데히드의 결합 및 글루타알데히드와 효소의 결합은 이미드 결합인 것이 바람직하다.

[0021] 본 발명의 다른 일구현예에 의하면, 상기 기준 전극은 Ag/AgCl 기준 전극인 것이 바람직하고, 상기 상대 전극은 백금 상대 전극인 것이 바람직하다.

[0022] 또한 본 발명은 금(Au) 전극위에 은나노선층을 형성하는 단계; 상기 은나노선층이 형성된 금(Au) 전극을 시스테아민 용액 중에 담금으로써 은나노선층상에 시스테아민층을 형성하는 단계; 상기 시스테아민층이 형성된 전극의 표면을 글루타알데히드 용액에 노출시킴으로써 시스테아민과 글루타알데히드를 결합시키는 단계; 상기 글루타알데히드 처리된 전극을 효소를 함유하는 용액에 담금으로써 효소를 상기 전극에 결합시키는 단계;를 포함하는 것을 특징이다.

[0023] 본 발명의 일구현예에 의하면, 상기 금(Au) 전극위에 은나노선층을 형성하는 단계는 은나노선을 함유하는 용액을 금(Au) 전극위에 떨어뜨린 후 건조시키는 과정을 반복함으로써 수행할 수 있다.

- [0024] 또한 본 발명의 다른 일구현예에 의하면, 상기 은나노선은 Pt 시드 및 PVP의 존재하에 에틸렌글리콜을 이용하여 AgNO₃를 환원시키는 방법으로 형성할 수 있다.
- [0025] 도 1에는 본 발명에 따른 은나노선을 이용한 과산화수소 검출용 바이오센서의 개략적인 예시도가 나타나있다. 상기 도면에서 기준 전극은 Ag/AgCl, 상대 전극은 백금(Pt), 그리고 작업 전극으로는 은나노선을 포함하는 전극이 도시되어 있다.
- [0026] 한편 도 2에는 은나노선으로 개질된 전극의 제조과정이 단계적으로 나타나있다. 먼저 1단계는 금(Au) 전극상에 은나노선층을 형성하는 단계이다. 2단계는 시스테아민과 아미노기 말단의 단일층을 형성하는 단계이며, 3단계는 글루타알데히드의 알데히드기와 시스테아민의 아미노기를 이미드결합으로 연결하는 단계이다. 마지막으로 4단계는 글루타알데히드의 또 다른 알데히드기와 HRP(Horseradish peroxide)의 N-말단부 사이에 이미드결합을 형성하는 단계이다.
- [0027] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0028] 실시예 1: 은나노선의 제조
- [0029] 은나노선은 Pt 시드(seed) 및 PVP의 존재하에 에틸렌글리콜로 AgNO₃를 환원시켜 합성하였다. 이러한 방법을 폴리올(polyol) 과정이라고 부른다. 통상적인 합성 방법에 따라 콘텐서와 온도조절기 및 마그네틱 스테어링바가 있는 둥근바닥 플라스크에 5 mL의 에틸렌글리콜을 넣고 160℃에서 120분 동안 환류시켰다.
- [0030] 0.5 mL의 PtCl₂ 용액(1.5×10^{-3} M, 용매: 에틸렌글리콜)을 가열된 에틸렌글리콜에 첨가하였다. 4분 후에, 2.5 mL AgNO₃ 용액 (0.12 M in EG) 과 5 mL PVP 용액 (0.36 M, 용매: 에틸렌글리콜)을 KDS-100 시리즈 베이직 실린지 펌프(미국 kd Scientific사 제조)를 이용하여 6분 동안 고온 혼합용액에 동시에 주입하였다. 주입 후, 반응 혼합물을 160℃에서 6분 동안 추가로 환류시켰다. 강렬하게 마그네틱 교반을 계속 수행하여 AgNO₃를 환원시켜 와이어를 성장시켰다. 생성물은 원심분리기로 정제하였다. 본 발명에서, 반응혼합물은 아세톤으로 희석했으며, 15분 동안 4000 rpm 으로 원심분리했다. 은 입자를 포함하는 상층액은 피펫을 이용하여 쉽게 제거할 수 있었다. 또한 원심분리과정은 상층액이 무색이 될 때까지 여러 번 반복했다.
- [0031] 실시예 2: 은나노선으로 개질된 전극의 제조
- [0032] 은나노선을 함유하는 용액을 40℃ 핫플레이트에서 금(Au) 전극 위에 반복적으로 떨어뜨리고, 건조시켰다. 그 다음 은나노선으로 개질된 전극을 실온에서 10시간 동안 1mM 시스테아민 에탄올 중에 담가놓았다.
- [0033] 본 발명에서, 은 나노물질은 음이온에 의해 안정화되었고, 시스테아민 단일층의 아미노기 말단은 프로토네이션되어 양전하를 나타내었다. 정전흡착(electrostatic adsorption)에 의해 시스테아민 단일층이 은 나노물질의 표면에 형성되었다. 상기 와 같이 개질된 전극을 증류수로 행구어 물리적으로 흡착된 시스테아민을 제거하고, 건조하는 동안 질소 기체를 불어주었다.
- [0034] 1시간 동안 5% 글루타알데히드 용액에 전극표면을 노출시킴으로써 시스테아민과 효소를 연결하기 위해 전극을 글루타알데히드로 개질하였다. 그 다음 글루타알데히드로 활성화된 전극을 증류수로 행구고, 질소가스 퍼지하에 건조시켰다.
- [0035] 그 다음 단계로, 24시간 동안 효소를 함유하는 50 mM PB 용액(pH 7.0)에 전극을 담금으로써 효소 분자의 N-말단과 글루타알데히드로 활성화된 전극 사이에 이미드 결합을 형성시켰다. 효소층이 형성된 후에, 전극을 인산 버퍼 용액을 흘려가면서 행금으로써 잔여 모노머 또는 약하게 결합된 효소 분자를 제거하였다.
- [0036] 시험예 1: 전기화학적 측정

[0037] 도 3은 은나노선으로 개질된 전극의 SEM 사진이다. 확대 부분에서 은나노선이 금(Au) 전극상에 잘 분산되어 있음을 확인할 수 있다. 잘 분산된 은나노선은 유효 면적을 증가시켜, 많은 효소를 고정할 수 있다. 도 3에서 보여지는 바와 같이, 상기 나노선은 60nm 이하의 평균 직경을 가지며, 표준편차는 8nm 이하였다.

[0038] 개질 전극의 유효 작업 면적은 Randles' slope로부터 계산되었으며, 그 결과는 표 1에 요약되어 있다. 하기 결과는 은나노선을 이용하여 개질된 전극의 유효 표면적이 박막 구조를 갖는 금(Au) 전극의 유효 표면적 보다 16.5배 정도 증가했다는 것을 보여준다.

[0039]

전극	Linearity (R^2)	Randles Slope	유효 전극면적 (cm^2)
순수 금(Au) 전극	0.9958	0.145	0.62
개질 전극	0.9992	2.394	10.24

[0040] 과산화수소의 전류 검출은 50mM 인산 버퍼 용액 중의 과산화수소 수용액 샘플을 이용하여 측정되었으며, 이때 적용 전압은 SCE 전극에 대해 -0.4 V였다.

[0041] 도 4에서 보여지는 바와 같이, 본 발명에 따른 개질 전극의 전류 민감도는 선형적인 값을 나타내며, 4.8 nM ~ 0.31 μM 범위에서 약 2.55 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ (상관계수 $r = 0.9969$)였다.

[0042] 본 발명에 따른 바이오센서는 4°C에서 보관되었고, 35일 동안 상대적인 반응성이 주기적으로 측정되었다. 센서 반응성은 시간함수로써 기록되었으며, 기록 결과 28일 동안 안정하게 유지된다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 상기 바이오센서는 35일 동안 유지된 후에는, 초기 반응성의 약 82% 정도만이 유지되었다. 이러한 결과는 감소된 효소 활성 때문이었는데, 효소 전극의 감소된 활성은 효소막의 기계적 손상 때문으로 예상되며, 이는 박리(peeling) 현상인 것으로 추정된다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명에 따른 과산화수소 검출용 바이오센서의 개략도이다.

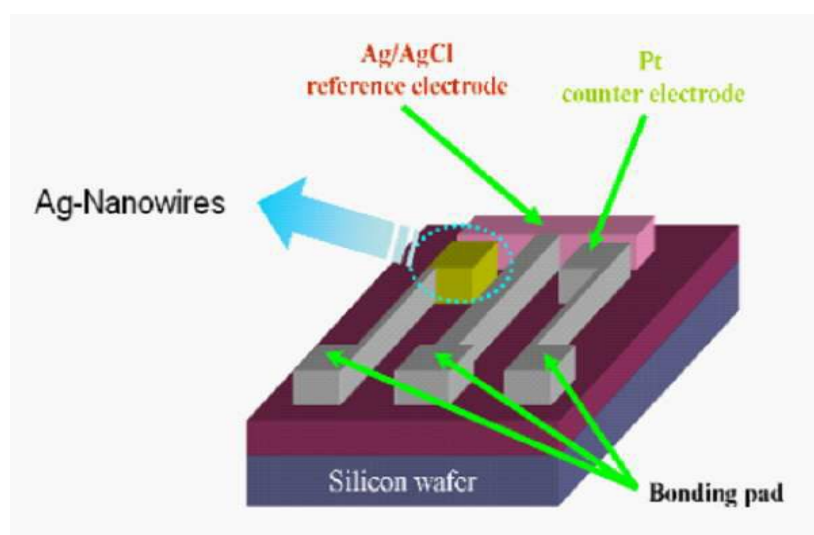
[0044] 도 2는 은나노선으로 개질된 전극의 제조과정을 나타내는 흐름도이다.

[0045] 도 3은 본 발명에 따른 은나노선으로 개질된 전극의 SEM 이미지이다.(Scale bars, 1 μm (inset: 100nm))

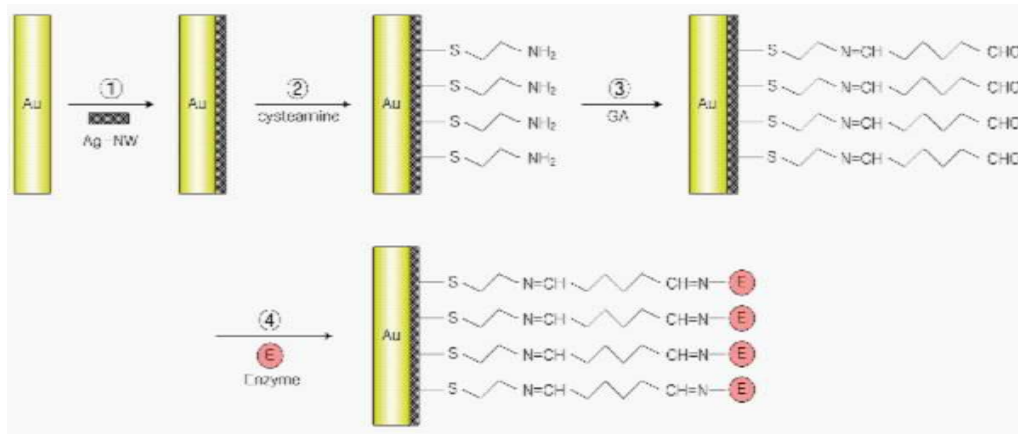
[0046] 도 4는 pH 7.0에서 50mM PBS 중의 여러 농도의 과산화수소에 대해 측정된 전류 교정 그래프이다.

도면

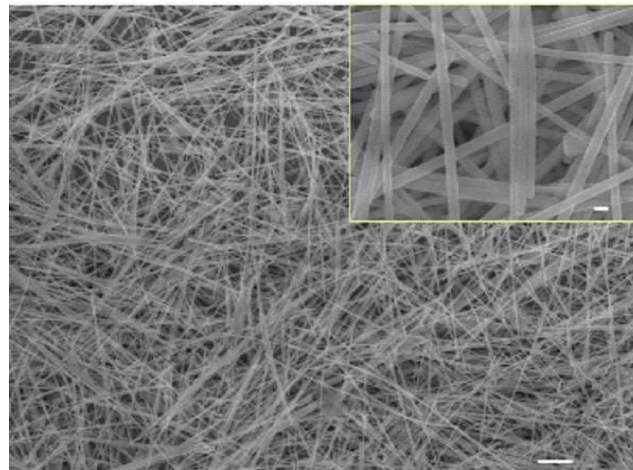
도면1



도면2



도면3



도면4

