

산화아연 나노구조를 이용한 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 센서 제작

장윤석, 박정일, 남윤경, 박정호
고려대학교 전기전자전파공학과

Fabrication of a influenza A H1N1 sensor using ZnO nanostructure

Yunseok Jang, Jungil Park, Yoonkyung Nam and Jungho Pak
School of Electrical Engineering, Korean University

Abstract - 본 논문에서는 H1N1 인플루엔자 A 바이러스(influenza A H1N1 virus) 검출을 위한 산화아연 나노구조(zinc oxide nano structure) 기반의 전기화학적 면역센서를 제작하고 그 특성을 분석하였다. H1N1 인플루엔자 A 바이러스는 빠른 전과 속도 때문에 정확하고 빠른 검출이 필요하다. 먼저, 2 mm²의 표면적을 갖는 패터닝된 금 전극 위에 열수방식(hydrothermal method)으로 성장시킨 산화아연 나노구조가 선택적으로 형성되도록 리프트-오프(lift-off) 방법을 사용하였다. 0.01 M phosphate buffered saline(pH 7.4)에서 2 µg/mL 농도의 1차 항체를 정전기에 의해 산화아연 나노구조에 고정화한 후, 10 pg/mL ~ 5ng/mL 농도의 H1N1 항원을 적용하여 포획 항체에 결합시키고 HRP(horseradish peroxidase) 효소가 결합된 검출 항체를 항원에 결합시키는 샌드위치 ELISA법을 이용하였다. HRP와 반응하는 TMB(3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine)와 과산화수소가 포함된 acetate buffered 용액(pH 5)을 전해질로 사용하고 순환전압전류 측정법(cyclic voltammetry)으로 센서의 특성을 분석하였다. 측정된 순환전압전류그래프(cyclic voltammogram)에서 H1N1 항원 농도 10 pg/mL ~ 5 ng/mL의 응답 전류는 276.47 ± 21.72 nA (평균 ± 표준편차, n=4) ~ 478.89 ± 6.21 nA로 측정되었고, logarithmic하게 증가하는 응답 전류 특성을 보였다.

1. 서 론

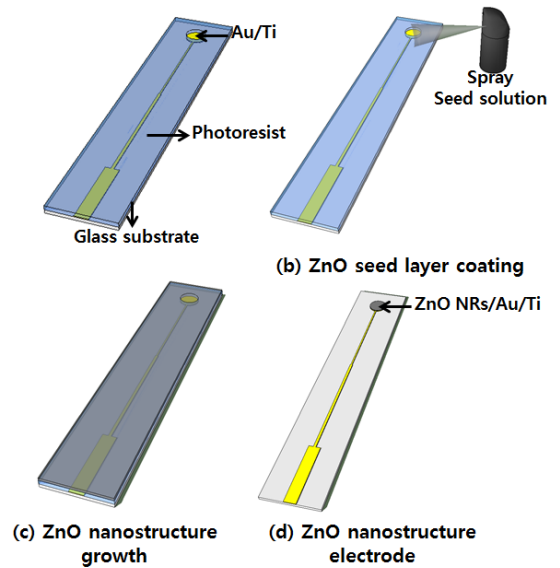
H1N1 인플루엔자 A 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스가 변이를 일으켜 생긴 바이러스로, 2009년 3월부터 전파되기 시작하여 미국, 유럽, 아시아 지역으로 빠른 속도로 확산되었다. 전 세계적으로 14,000명 이상이 사망하였고[1], 국내에서도 170명 이상의 환자가 바이러스에 감염되어 사망하였다. 이러한 빠른 전과 속도 때문에 H1N1 인플루 A 바이러스를 정확하고 빠르게 검출해야 한다. 현재의 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 확진 검사를 위해서 real-time RT-PCR 방법을 사용하고 있지만, 검사시일이 오래 걸리고 고가의 측정 장비가 필요하다는 단점을 가지고 있다[2]. 포획항체와 검출항체를 이용하여 단백질(항원)을 검출하는 샌드위치 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방식을 사용한 면역센서는 매우 높은 민감도와 특이성을 가지고 있고, 검사가 간단하고, 자동화와 검사시간을 최소화 시킬 수 있다. 나노구조를 갖는 산화아연(ZnO)은 넓은 표면 면적, 생체 적합성, 화학적 안정성, 무독성인 특성을 가질 뿐만 아니라, 생체 모방성과 높은 전자 전달성을 가지고 있어[2-4] 전기화학적 측정방식의 바이오센서의 전극물질로 사용되고 있다[5-6]. 나노구조의 산화아연을 바이오센서 전극에 적용하기 위해 낮은 온도에서 간단한 방법으로 저렴하게 성장시킬 수 있는 열수방식(hydrothermal method)이 사용되고 있다[7]. 또한 ZnO는 등전점(isoelectric point, IEP ~ 9.5)이 높아 IEP값이 작은 단백질(항원, 항체, IEP ~ 4.2)을 정전기 상호 작용으로 잘 흡착시켜 ZnO 표면에 많은 양의 단백질(항원, 항체)을 고정화시킬 수 있는 장점이 있다[8].

본 논문에서는 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출을 위한 면역센서의 전극을 구현하기 위해 열수방식과 리프트-오프(lift-off) 방법으로 산화아연 나노구조를 전극 위에 패터닝하였고 미량의 항체 및 항원을 사용하여 산화아연 나노구조 기반의 전기화학적 면역센서를 제작하였다. 그리고 제작된 면역센서는 전기화학적 측정법인 순환전압전류법(cyclic voltammetry)으로 면역센서의 특성을 분석하였다.

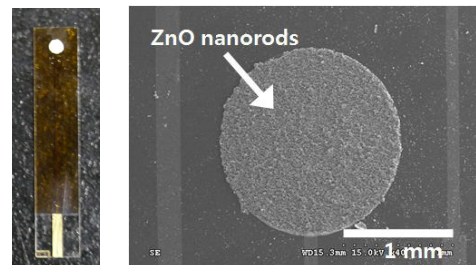
2. 본 론

2.1 산화아연 나노구조 센서 제작

산화아연 나노구조 기반의 면역센서를 구현하기 위해 포토리지스트(photoresist) 리프트-오프(lift-off) 방법과 열수방식을 사용하였다. 그림 1은 포토리소그래피(photolithography) 공정과 열수방식[7]을 이용하여 금 전극 위에 산화아연 나노구조를 패터닝하는 과정을 보여준다. 그림 1a



<그림 1> ZnO nanostructure 전극 제작과정



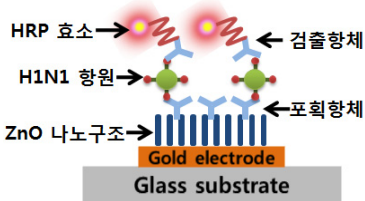
<그림 2> 열수방식과 리프트-오프 방법으로 패터닝된 산화아연 나노구조 기반의 면역센서 전극

와 같이 금 전극이 패터닝된 유리기판 위에 음성 포토리지스트(negative photoresist, DNR-L300)를 코팅한 후, 포토리소그래피 공정으로 포토리지스트를 패터닝하여 금 전극만 외부에 노출시킨다. 노출된 금 전극 위에 산화아연 나노구조를 성장시키기 위해 먼저 ZnO seed layer를 코팅한다. ZnO seed layer 코팅은 메탄올에 녹인 0.03 M의 수산화나트륨 용액과 0.03 M의 zinc acetate dihydrate 용액을 60 °C 400 rpm에서 2시간 동안 stirring 하여 만든 후 spray 방법으로 한다(그림 1b). 증류수(de-ionized water)에 녹인 0.05 M의 zinc nitrate hexahydrate 용액과 0.05 M의 hexamethylenetetramine 용액을 혼합하여 ZnO 성장 용액을 만들고, ZnO seed layer가 코팅된 기판을 성장 용액 안에 넣고 90 °C oven에서 6시간 동안 산화아연 나노구조를 성장시킨다(그림 1c). 그 후 아세톤으로 포토리지스트를 제거하여 금 전극 위에 산화아연 나노구조만 남게 한다(그림 1d). 그림 2는 열수방식과 리프트-오프 방법으로 패터닝된 산화아연 나노구조 전극의 SEM 사진을 보여준다.

2.2 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출 전기화학적 면역센서 제작

H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출용 면역센서 제작을 위해 그림 3과 같이 포획항체-H1N1 항원-검출항체-HRP 효소 결합체 형태인 샌드위치 ELISA법을 이용하였다. 포획항체를 0.01 M PBS(phosphate

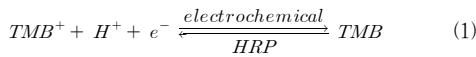
buffered saline) 용액(pH 7.4)에 2 µg/mL 농도로 희석한 후 1분 동안 sonicator로 분산시키고 산화아연 나노구조 기반의 면역센서 전극 위에 2 µL를 떨어뜨려 37 °C에서 1시간 동안 고정화 시킨다. 포획항체 고정화가 끝난 전극을 5% Tween 20 용액에서 30초간 세척하여 고정화가 되지 않은 포획항체를 제거한다. 세척이 끝난 후 전극 blocking을 위해 1% BSA(bovine serum albumin) 용액 2 µL를 전극에 떨어뜨려 37 °C에서 1시간 동안 고정화 시킨다. PBS용액(pH 7.4)으로 H1N1 항원을 10 pg/mL ~ 5 ng/mL 농도로 희석시켜 1분 동안 분산시킨 후, H1N1 항원 농도별로 각각의 전극에 2 µL를 전극에 떨어뜨려 37 °C에서 1시간 동안 포획항체에 결합시킨다. 검출항체-HRP 효소 결합체를 0.01 M PBS 용액(pH 7.4)에 2 µg/mL로 희석한 후 1분 동안 분산시켜 2 µL를 전극에 떨어뜨려 37 °C에서 1시간 동안 포획항체에 결합되어 있는 항원과 결합시킨다. 검출항체-HRP 효소 결합체 고정화가 끝난 후에 5% Tween 20 용액에서 30초간 세척하여 고정화가 되지 않은 검출항체-HRP 효소 결합체를 제거한다.



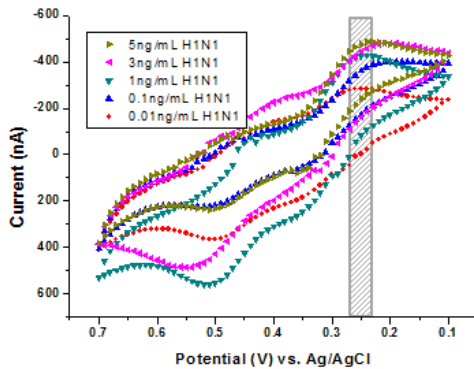
〈그림 3〉 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출 센서 전극의 모식도

2.3 전기화학적 측정 결과

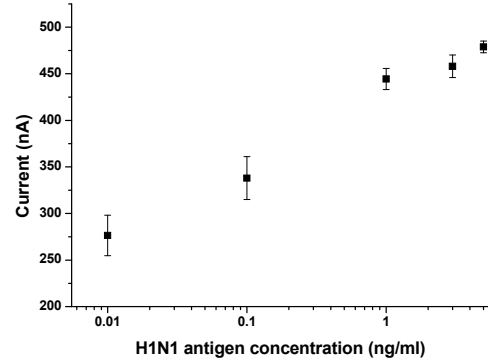
제작된 산화아연 나노구조 기반의 면역센서를 전기화학적으로 측정하기 위한 전해질로 0.1 mM TMB(3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine)과 2 mM 과산화수소가 혼합된 0.1 M acetate buffer 용액(pH 5)을 사용하였고, 작업전극으로는 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출용 면역센서, 기준전극으로 Ag/AgCl 전극, 상대전극으로 백금선을 사용하였다. 전기화학 측정 시스템인 potentiostat(PC4/750, Gamry Instruments, USA)에서 순환전압전류법(cyclic voltammetry)을 이용하여 제작된 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출용 면역센서의 항원의 농도에 따른 응답 전류를 측정하였고, 그 결과를 분석하였다. 응답 전류는 식 (1)과 같이 전해질 내에서 TMB와 HRP 반응을 전기화학적으로 측정한다.



100 mV/s의 속도와 0.7 V ~ 0.1 V 범위에서 순환전압전류법으로 측정된 결과, 그림 4와 같이 10 pg/mL ~ 5 ng/mL H1N1 항원 농도에 대한 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출용 면역센서의 응답 전류 반응을 나타내었다. 그림 5는 그림 4에서 전압이 0.25 V 일 때 TMB⁺의 환원 전류값을 H1N1 항원 농도에 따른 응답 전류값으로 나타낸 것이다. 10 pg/mL ~ 5 ng/mL H1N1 항원 농도에 대한 TMB⁺ 환원 전류값은 276.47 ± 21.72 nA (평균 ± 표준편차, n=4) ~ 478.89 ± 6.21 nA로 측정되었다. 이를 통하여 항원의 농도가 증가할수록 TMB⁺의 환원전류값이 증가한다는 것을 알 수 있고 전극 위 포획항체에 결합된 항원의 개수가 증가하여 이에 결합된 검출항체의 수가 증가하였다는 것을 알 수 있다. H1N1 항원 농도가 증가할수록 센서의 응답 전류가 logarithmic하게 증가하였다.



〈그림 4〉 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출 센서의 cyclic voltammetry 측정 결과



〈그림 5〉 H1N1 항원의 농도에 따른 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출 센서의 전류 반응 결과

3. 결 론

H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출을 위해 열수방식과 리프트-오프 방법을 이용하여 금 전극 위에 산화아연 나노구조 기반의 전기화학적 면역센서를 제작 및 특성평가를 하였다. H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출용 면역센서 제작을 위해 포획항체-H1N1 항원-검출항체-HRP 효소 결합체 형태인 샌드위치 ELISA법을 이용하였고, 순환전압전류법으로 전기화학적 면역센서의 특성을 평가하였다. 제작된 면역센서는 H1N1 항원 농도가 10 pg/mL ~ 5 ng/mL 범위에서 logarithmic하게 응답 전류가 증가하였다. 앞으로 10 pg/mL 이하의 저농도 H1N1 항원에서 응답 전류 특성을 실험할 계획이며, 전극의 집적화와 센서의 소형화를 통해 현장진단 시스템에 응용할 예정이다. 또한 제작된 산화아연 나노구조 기반의 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 검출용 전기화학적 면역센서는 다양한 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 농도를 정확하고 빠르게 검출을 하는데 사용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 서울시 R&BD 프로그램 (No. 10920)과 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (Nos. 20100008474, K20902001448-10E0100-03010).

[참 고 문 헌]

- [1] World Health Organization, http://www.who.int/csr/don/2009_10_23/en/index.html
- [2] Burmeister, J. J, et. al., "Self referencing ceramic based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of L-glutamate and other analytes", Analytical Chemistry, Vol. 73, pp.1037-1042, 2001
- [3] Norton, D. P, et. al., "ZnO: Growth, doping & processing", Materials Today, Vol. 7, pp.34-40, 2004
- [4] Sun, X. W, et. al., "Optical properties of epitaxially grown zinc oxide films on sapphire by pulsed laser deposition", Journal of Applied Physics, Vol. 86, pp.408-411, 1999
- [5] Wang, J. X, et. al., "Zinc oxide nanocomb biosensor for glucose detection", Applied Physics Letters, Vol. 88, 233106, 2006
- [6] Zhao, Z. W, et. al., "ZnO-Based Amperometric Enzyme Biosensors", Sensors, Vol. 10, pp.1216-1231, 2010
- [7] Wang, Z. L, "ZnO nanowire and nanobelt platform for nanotechnology", Materials Science & Engineering R-Reports, Vol. 64, pp.33-71, 2009
- [8] Wang, Z. L, "Adsorption of bovine serum albumin on polyether sulfone ultrafiltration membranes: Determination of interfacial interaction energy and effective diffusion coefficient", Journal of Membrane Science, Vol. 278, pp.251-260, 2006