

## Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노분말을 이용한 전기화학적 비효소 면역센서 응답특성

김창규 · 이경자 · 엄영랑 · 이민구\* · 이창규  
한국원자력연구원 원자력재료연구부 나노소재응용팀

### Response Characteristics of Electrochemical Non-enzyme Immunosensor using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticle

Chang-Kyu Kim, Gyoung-Ja Lee, Young-Rang Uhm, Min-Ku Lee\* and Chang-Kyu Rhee  
Nuclear Materials Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI),  
Daejeon, 305-353, Republic of Korea

(Received March 12, 2009; Revised April 1, 2009; Accepted April 8, 2009)

**Abstract** In this paper, the electrochemical non-enzyme immunosensor has been developed for the determination of salmonella antigen, using inverse voltammetry. For the estimation of salmonella antigen concentration, the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized by microemulsion method were conjugated with salmonella antigen. Then, the immunocomplex between antibody immobilized on the transducer surface and antigen containing a magnetic nanoparticles was formed. From the linear relationship between the reduction peak current of Fe(III) and salmonella antigen concentration, it is suggested that the electrochemical non-enzyme biosensor is applicable to detect salmonella antigen in the concentration range of 10<sup>1</sup>-10<sup>5</sup> CFU/ml.

**Keywords** : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Biosensor, Non-enzyme, Electrochemical, Inverse voltammetry

## 1. 서 론

나노 바이오센서 중 차세대 성장주로 주목 받는 센서는 광섬유, 나노입자, 캔틸레버, 나노와이어 바이오센서들이 유비쿼터스를 이루기 위한 강세를 여전히 유지하고 있다. 나노입자 바이오센서는 여전히 효소가 강세를 이루지만 최근 개발한 항체를 센서 입자에 도포하는 방법으로 바이러스 존재유무를 파악하는 면역센서가 각광을 받고 있다. DNA를 이용한 고도의 기술개발과 함께 식품, 의료검진 등에서 이용 가능한 저가의 면역센서 개발에 집중하는 연구가 점차 증가하는 추세이다. 국내에서는 광학센서를 이용한 암 진단 센서가 개발되기도 하였으나 저가진단센서 개발은 아직도 요원하다[1-4].

본 연구는 제조가격이 저렴한 철 산화물(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)을 이용하는 센서기술로 Ag, Au 등의 귀금속 메탈을 이용하는 것보다 상업적 이용 측면에서 유리할 것이

며, 비효소를 사용하면서 동시에 나노기술을 접목시켜 센서의 안정성을 높일 수가 있다[5-6]. 또한 전기화학적 측정방식은 기존의 측정방식에서 문제되었던 검출 시간 및 전문인력 필요성에 대한 단점을 보완할 수 있다.

## 2. 실험

### 2.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노분말의 제조

박테리아 인식이 가능한 바이오센서의 나노분말 표지법 개발을 위하여 수십 나노의 균일한 크기를 가지는 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 제조 방식으로 마이크로에멀전 방법을 이용하였다. 표 1과 같이 Fe<sup>2+</sup>와 Fe<sup>3+</sup> 염이 1:2로 녹아있는 암모니아(Na<sub>4</sub>OH) 용액을 이용하여 분말 제조를 실시하였다. Fe<sup>3+</sup> 이온은 hydrazine과 반응시켜 ethylene glycol 용매 내에서 제조하였다[7].

제조된 나노분말은 균일한 분산 및 표면 기능 향

\*Corresponding Author : [Tel : +82-42-868-8565; E-mail : leeminku@kaeri.re.kr]

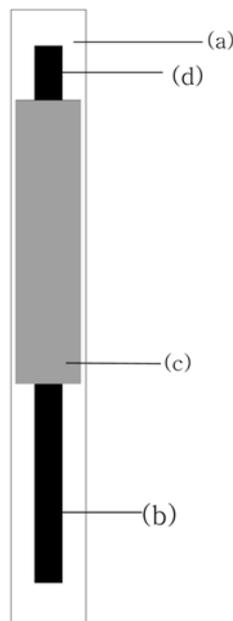
**Table 1. Preparation conditions of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle**

System	Microemulsion I	Microemulsion II
Water phase 34%	FeCl <sub>2</sub> +FeCl <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> OH
Organic phase 44%	n-octane	n-octane
Surfactant 12%	CTAB	CTAB
Cosurfactant 10%	n-butanol	n-butanol

상을 위하여 dextran, protamin, polyethy-leneimine 과 polyethylene glycol 등으로 코팅을 실시하였다. 다음으로 나노마커로 표시된 항원을 제조하기 위해 1 mg/ml salmonella 항원과 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 부유 액을 혼합하였다. 37°C에서 30분 동안 인큐베이션을 실시하였고 salmonella 항원과 결합되지 않은 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노분말의 제거를 위해 자기력 선별법을 이용하였다[8].

## 2.2. 바이오 센서

그림 1은 전체적인 electrode circuit을 보여주고 있다. (a)는 절연체 물질을 사용한 support, (b)는 전도 물질을 사용한 트랜스듀서 부분, (c)는 절연분리 층으로 cementite를 사용하였고 (d)는 센서의 실제 작업영역으로 면적은 2.5\*2.5 mm<sup>2</sup>이다. 센서의



**Fig. 1. Schematic view of the thick-film electrode: (a)-support made of nonconducting material, (b)-track made of conducting material (transducer), (c)-isolator layer and (d)-working surface of electrode.**

전극은 스크린 프린팅을 이용하여 후막으로 제조하였다. 폴리머 기판 위에 전극으로 쓰일 부분은 카본 잉크를 이용하였고, 저항을 줄이기 위해 2번의 반복 작업을 실시하였다.

센서의 트랜스듀서 표면 위 항체를 고정시키기 위해 salmonella 항체(titer 1:1200) 10 μl를 취하여 37°C에서 30분 동안 인큐베이션을 실시하였다. 비특이적 반응을 최소화하기 위하여 1% BSA 처리를 한 후 salmonella 항원과 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>가 결합된 용액 내에 30분간 반응을 시켜 immunocomplex(면역복합체)를 형성하였다.

트랜스듀서 표면 위 형성된 면역복합체는 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18M) 30 μl, HNO<sub>3</sub>(14M) 30 μl 혼합용액에 용해되어 잔여물이 생길 때까지 가열하여 잔여물은 증류수로 처리하였다. 전기화학적 분석을 위한 바탕용액으로는 2차 증류수 및 pyrocatechol 보충된 알칼리 및 초산나트륨의 혼합에 의해 이루어졌다. Inverse voltammetry 방식에 의하여 분석이 이루어졌으며, 철 농도 결정은 표준 보충 방법을 통하여 증명되었다[9].

또한, Sandwich 측정 방식으로 센서의 민감도를 측정하였다. 센서의 트랜스듀서 표면 위에 다클론 항체 10 μl를 고정 후, salmonella 항원과 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>가 결합된 항체가 결합된 복합체를 반응 시켰다. 이 3 구조(항체-항원-나노마커 항체) 물질을 황산과 질산 혼합용액에 용해하여 inverse voltammetry 측정법에 의하여 분석이 이루어졌다[10].

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 나노분말의 제조 및 센서 물질 선택

그림 2(a)는 TEM image로써 마이크로에멀전 방법을 이용하여 제조된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노 분말이 30 nm의 균일한 입도 크기를 나타내고 있다. 또한 (b)는 나노분말의 X선 회절 패턴(X-ray diffraction)이다. 분석 결과 주 피크(peak)(311)로부터 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노분말임을 알 수 있었다.

그림 3(a)는 합성된 나노분말의 분산성 향상을 위한 polyethylenimine 폴리머 코팅 실험 전, Fig. 3(b)는 후 사진이다. 폴리머 코팅 후 분산성 향상뿐만 아니라 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노 분말의 표면전하가 (-)charge에서 (+)charge로 변하게 되어 (-)charge를 띠는 salmonella 항원과 더욱 강한 결합 현상이 일어난다. 표 2는 트랜스듀서 물질에 따른 단백질 흡착 상태를 보여주고 있

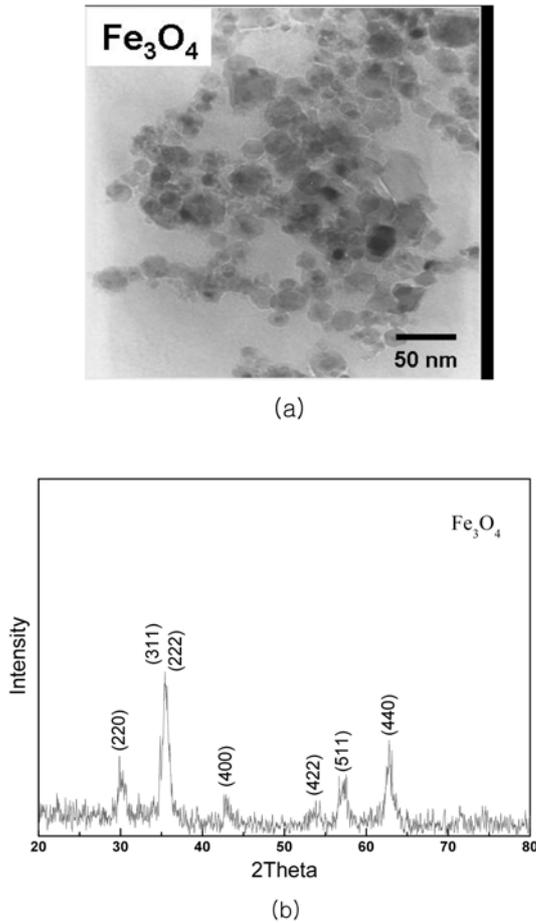


Fig. 2. (a) TEM image of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  with 30 nm size and (b) results of X-ray diffraction of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles.

다. Graphite-epoxy composition(TGC)과 carbonaceous ink(TCC), 특히 TCC는 Metech(USA), Gwent(Great Britain), Electrodag(Netherlands)로 총 4종류의 물질을 비교 실험하였다. 흡착생체 기능 물질의 흡착성 측정을 위하여 bovine albumin을 이용하였다. Spectrophotometer를 사용하여 용액 내에 초기 단백질 농도와 최종 단백질 농도 차이는 식 (1)에 의하여 계산하였다.

$$x = \frac{A_1}{A_2} \times C \quad (1)$$

$A_1$ 은 테스트 샘플 용액의 광학적 밀도,  $A_2$ 는 control 샘플 용액의 광학적 밀도, C는 bovine albumin 농도로써 70 mg/ml이다. 그리고 X는 센서 투입 후 용액의 잔류 단백질 농도를 나타낸다.



(a)



(b)

Fig. 3. The photograph before using polyethylenimine (a) and after using polyethylenimine (b) respectively.

Table 2. Concentration of remaining bovine albumin after submersion of transducer material

Transducer	Xmean, g/l	Sr. %
TGC	12.9±0.6	3.7
TCC, Metech	54.8±1.6	2.3
TCC, Gwent	32.2±2.8	7.1
TCC, Electrodag	71.9±2.2	2.5

실험결과 잔여 단백질이 가장 적은 TGC 물질이 단백질에 대한 최적의 흡착성을 나타냈고 이 물질을 센서 트랜스듀서 물질로 적용하였다.

### 3.2. 센서의 전기화학적 특성

그림 4는 salmonella 항원 농도( $10^1$ - $10^3$  CFU/ml)

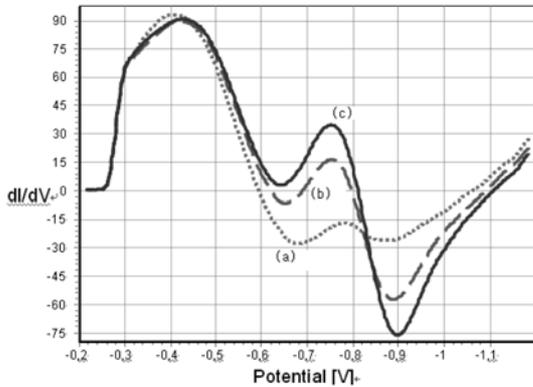


Fig. 4. Cathode voltammograms of adsorbate (pyrocatechin-Fe(III) complex), in test samples-cell with nanoparticles: (a) 10<sup>1</sup> CFU/ml, (b) 10<sup>2</sup> CFU/ml and (c) 10<sup>3</sup> CFU/ml salmonella antigen concentration.

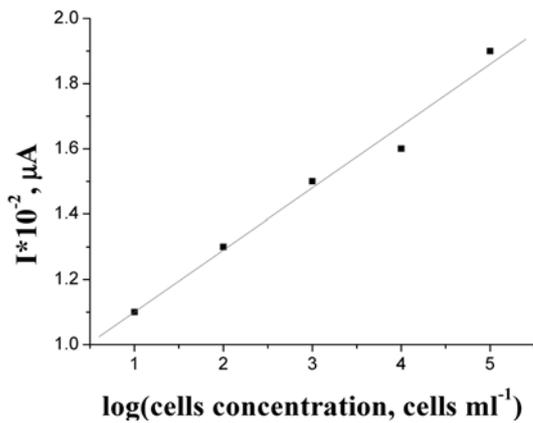


Fig. 5. Dependence of the current required for reduction of iron(III) on the decimal logarithm of cell number: the concentration range of 10<sup>1</sup>-10<sup>6</sup> CFU/ml.

에 따른 전기화학적 특성 그래프이다. 면역복합체 반응을 일으킨 센서를 질산-황산 혼합용액에서 끓여 Fe<sup>3+</sup> 이온으로 녹아 나온 것을 inverse voltammetry

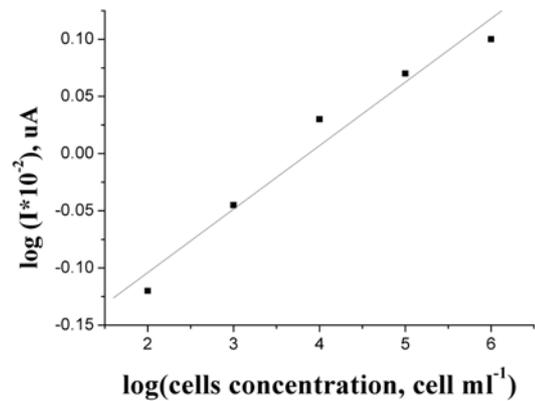


Fig. 6. Dependence of the current required for reduction of iron(III) on the decimal logarithm of cell number: the concentration range of 10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> CFU/ml.

측정법을 통하여 Fe<sup>3+</sup> 이온이 Fe<sup>2+</sup> 이온으로 환원되는 전류값을 측정된 결과이다. -0.80±0.05 V의 전위에서 환원피크가 관찰되었으며, 환원 전류값을 항원 농도에 따라 플롯한 결과는 그림 5에 나타내었다. 결과적으로 salmonella 항원 농도 10<sup>1</sup>-10<sup>5</sup> CFU/ml의 범위에서 선형적인 민감도로 측정 가능함을 알 수 있다.

그림 6은 sandwich 기법에 의한 salmonella 항원 농도에 따른 전기적 특성을 보여주고 있다. 환원되는 전류값을 측정된 결과 salmonella 항원 농도 10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> CFU/ml의 범위에서 선형적인 민감도를 나타냈다.

기존에 널리 알려진 생체 반응 측정 방식인 선택 배지(Si\*1 agarized 배지), on-line PCR(“Eppendorf Mastercycler gradient”(Germany))과 본 연구에서 제시한 전기화학적 분석 방법과의 비교를 하였다. 표 3에 각각의 결과에 대하여 나타내었다. 선택 배지상의 salmonella 항원 접목에 의한 적정 방법의 민감도는 10<sup>3</sup> CFU/ml로 나타났으며 on-line PCR의 민

Table 3. The results of electrochemical methods in comparison with traditional methods – titration by microbiological inoculation on a selective medium and on-line PCR

Dilution	CFU/ml	Microbiological inoculation	On-line PCR	Electrochemical method
0	10 <sup>6</sup>	+	+	+
-1	10 <sup>5</sup>	+	+	+
-2	10 <sup>4</sup>	+	+	+
-3	10 <sup>3</sup>	+	+	+
-4	10 <sup>2</sup>	-	+	+
-5	10 <sup>1</sup>	-	-	-
-6	0	-	-	-

감도는 약  $10^2$  CFU/ml로 나타났으며 전기화학적 분석으로의 민감도는  $10^2$  CFU/ml 이하로 나타났다. 따라서 연구 결과를 통하여 salmonella 정량 판별을 위하여 제시된 나노마커 및 전기화학적 방법은 감도와 특이성이라는 측면에서 기존에 전통적으로 사용되어 오던 방법들에 비하여 뛰어난 특성을 보임을 알 수 있다.

#### 4. 결 론

귀금속이 쓰여온 나노마커 물질을 화학적 방식을 이용하여 제조된  $Fe_3O_4$ 로 대체하여 실험을 실시하였다. 생체물질과 가장 좋은 흡착 특성을 보이는 TGC 물질을 센서의 트랜스듀서에 적용하였으며 항원에 나노 분말을 결합 또한 항체에 나노 분말을 결합 시켜 민감도 측정을 하였다. 결과적으로 inverse voltammetry 측정법에 의하여 salmonella 항원 농도에 따른 환원 피크 값을 판별하였고, 선형적인 특성을 획득할 수 있었다. 또한 기존 실험방식인 선택 배지, PCR과의 센서특성 비교를 통하여 본 연구에서 제시된 전기화학적 측정 방식의 우수한 민감도를 확인하였다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국원자력연구원 창의연구사업과 지식경제부 국제공동연구개발사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- [1] J. Wang: *Electroanalysis*, **17** (2005) 7.
- [2] N. Wei, J. Chen, J. Zhang, K. Wang, X. Xu, J. Lin, G. Li, X. Lin and Y. Chen: N. Wei et al. *Talanta*, **78** (2009) 1227.
- [3] L. Wang, Q. Liu, Z. Hu, Y. Zhang, C. Wu, M. Yang and P. Wang: L. Wang et al. *Talanta*, **78** (2009) 647.
- [4] C. Ding, Q. Zhang and S. Zhang: *Biosensors and Bioelectronics*, **24** (2009) 2434.
- [5] D. T. Burcu, B. Uslu and S. A. Ozkan: *Biosensors and Bioelectronics*, **24** (2009) 2358.
- [6] P. Du, H. Li, Z. Mei and S. Liu: *Bioelectrochemistry*, **75** (2009) 37.
- [7] J. D. Qiu, M. Xiong, R. Ping, Liang, H. P. Peng and F. Liu: *Biosensors and Bioelectronics*, **24** (2009) 2649.
- [8] X. Liu, K. Danny and Y. Wong: *Talanta*, **77** (2009) 1437.
- [9] K. Brainina, A. Kozitsina and J. Beikin: *Anal Bioanal Chem.*, **376** (2003) 481.
- [10] D. Tian, C. Duan, W. Wang, N. Li, H. Zhang, H. Cui and Y. Lu: *Talanta*, **78** (2009) 399.