

제초제 검출을 위한 전기화학적 일회용 면역센서

장승철*

Disposable Electrochemical Immunosensors for the Detection of Herbicide

Seung-Cheol Chang*

Abstract

A disposable electrochemical immunosensor system has been developed for the detection of herbicide in aqueous samples. Disposable screen printed carbon electrodes(SPCE) were used as basic electrodes and an enzyme, horseradish peroxidase (HRP), and anti-herbicide antibodies was immobilised on to the working electrode of SPCE by using avidin-biotin coupling reactions. An herbicide-glucose oxidase conjugates have been used for the competitive immunoreaction with sample herbicides. The enzymatic reaction between the conjugated glucose oxidase and glucose added generates hydrogen peroxide, which was reduced by the peroxidase immobilised. The latter process caused an electrical current change, due to direct re-reduction of peroxidase by a direct electron transfer mechanism, which was measured to determine the herbicides in the sample. The optimal operational condition was found to be: 20 $\mu\text{g/l}$ -1 deglycosylated avidin loading to the working electrode and working potential +50 mV vs. Ag/AgCl. The total assay time was 15 min after sample addition. The detection limits for herbicides, atrazine and simazine, were found to be 3 ppb and 10 ppb, respectively.

Keywords : Screen Printed Carbon Electrode, Herbicide, Immunosensor, Biosensor

1. 서 론

현재 농·임업 분야에 광범위하게 사용되는 제초제는 토양, 하천 및 농축산물에 제초제 자체 성분이나 화학적 변화 물질이 잔류하여 긴 시간 동안 인체에 노출 또는 섭취 될 경우 60년대 이후 나타났던 고엽제 피해의 사례에서 볼 수 있듯이 인간의 건강 및 환경에 지대한 영향을 줄 수 있다[1,2]. 현재 제초제 내성의 심각성과 제초제 개발과 대량생산에 있어서의 문제점, 제초제 자체의 화학물질이 체내 유전자 및 환경에 미치는 영향이나 잔류 등의 문제를 다루는 분야에서는 현장에서 빠르고 정확하게 분석하고 판별하는 시스템을 필요로 하고 있다[3,4]. 크로마토그래피 및 ELISA(Enzyme liked immunosorbant assay)법과 같은 기존의 시료 채취 후 실험실에서 행해지는 분석법이 아닌 현장에서의 on-site 검출을 위해서는 1990년대부터 개발되어 온 휴대용 전기화학적 면역센서가 매우 적합한 시스템으로 관심을 가져오고 있다[5,6]. 전기화학적 면역센서는 간단한 전기적

인 신호로 측정 결과를 얻을 수 있기 때문에 널리 보급된 PC, PDA, 스마트폰 등과 쉽게 인터페이싱(interfacing)이 가능하며 특별한 신호 변환이 필요 없다는 장점이 있으나 현재 전기화학적 면역센서를 이용한 분석시스템은 사용되는 효소, 항원, 항체의 선택성과 센서의 측정감도가 제한되는 문제점으로 인하여 아직 널리 사용되고 있지 않다[7]. 이에 본 연구에서는 막프린트법에 의해 제작된 일회용 탄소전극(screen-printed carbon electrode, SPCE[7-11])을 기반으로 ELISA에서 필요 되는 시료 검출 시 수행해야 하는 분리과정을 생략할 수 있는 센서기반 시스템을 개발하였다.

2. 면역센서 제작 및 구동 원리

본 연구에서 개발된 전기화학적 일회용 면역센서는 막프린트법을 활용하여 만들어진 일회용 탄소전극(SPCE)을 기본으로 하여 HRP(horse radish peroxidase)와 면역반응을 위한 항체가 고정화 된 전극을 이용하여 개발 되었다. 효소는 본 본문의 저자가 발표한 논문[10]에서와 같은 방법으로 카본 잉크와 HRP용액을 혼합하여 HRP를 카본잉크 내의 탄소입자와 공유적으로 결합시킨 후 HRP-카본 잉크를 제조한 후 SPCE의 작업 전극

부산대학교 바이오피지오센서연구소 (Institute of BioPhysio Sensor Technology (IBST), Pusan National University)

*Corresponding author : s.c.chang@pusan.ac.kr

(Received : Nov. 2, 2010, Revised : Dec. 14, 2010,

Accepted : Dec. 15, 2010)

위에 직접 프린팅 하여 제작하였다[7,10,11]. 제초제 atrazine 과 simazine의 검출을 위해서 상기 제초제와 선택적으로 반응 하는 항체의 개발이 선행되었다. 본 저자의 선행 연구에서[12] 사용된 방법에 의하여 atrazine 검출을 위한 polyclonal anti-atrazine 항체, 그리고 atrazine-glucose oxidase 복합체 (conjugates, AGO), 그리고 simazine 검출을 위한 polyclonal anti-simazine 항체, simazine-glucose oxidase 복합체 (SGO)를 제작하였다. 그 외의 모든 시약은 상업적으로 구입하여 사용되었다.

제작된 면역센서의 측정원리를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에 도식된 바와 같이 가장 기본이 되는 구조인 HRP가 고정된 HRP-SPCE는 과산화수소(H₂O₂)와 선택적이고 민감한 전류법에 의한 전기화학적 반응을 나타내다[10]. 즉, 전기화학적인 H₂O₂ 검출이 가능해진다. 제초제 검출을 위해서 본 연구에서 사용된 각 제초제와 선택적으로 반응하는 항체의 고정화를 위해서 1mgml⁻¹ 의 deglycosylated avidin 표준용액을 50 mM carbonated buffer(pH 9.6) 를 이용하여 제조한 후 HRP-SPCE를 4 °C에서 10시간동안 담가 두었다. Avidin이 고정된 전극은 3 % (w/v) casein 용액을 사용하여 blocking 하였다. Polyclonal anti-atrazine 그리고 -simazine 항체는 EZ-Link™ Biotin Hydrazide biotinylation kit을 사용하여 biotin-항체 복합체를 제작한 후 2 μl 의 용액을 avidin 이 고정화된 HRP-SPCE 의 작업전극(지름: 1.5 mm) 위에 떨어뜨린 후 4 °C에서 12시간동안 avidin-biotin 결합을 완성하였다. 항체가 고정된 HRP-SPCE 는 농도를 알고 있는 AGO(혹은 SGO) 와 검출하고자 하는 각 제초제 시료와 섞은 용액 속에서 구동을 하게 된다. 면역반응에 의하여 선택적으로 결합된 AGO (혹은 SGO)의 농도는 시료 내에 넣어준 glucose와 효소 반응에 의해 생성된 H₂O₂의 농도와 비례하며 미지시료내의 제초제와 AGO(혹은 SGO)사이의 경쟁적 면역반응(competitive immunoassay)에 의하여 사용된 미지 시료내의 제초제의 정량적 그리고 정성적 분석이 가능해진다.

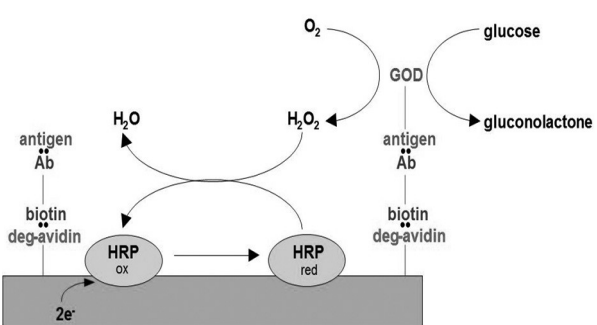


Fig. 1. Schematic diagram of disposable electrochemical immunosensors for the detection of herbicide.

3. 결과 및 고찰

3.1 Trinder시약을 사용한 Glucose oxidase activity 측정

제작된 면역센서를 이용하여 제초제 검출에 앞서 센서의 특성과 최적화된 검출 환경을 확정하기 위하여 센서의 각 제작 단계별 최적화를 수행하였다. 우선 제초제와 labeling 된 glucose oxidase의 activity 를 측정하였다. 효소의 activity 에 널리 사용되는 Trinder 시약을 사용한 분광학적인 방법[13]으로 분석한 결과 제초제가 labeling 이 안 된 순수한 glucose oxidase (GO)일 경우 55 Umg⁻¹, AGO는 20 Umg⁻¹ 그리고 SGO일 경우 17 Umg⁻¹의 activity 가 나타남을 확인 하였다. 비록 제초제의 labeling과정에서 약 50 % 이상의 GO의 activity가 감소함을 나타내었으나 본 센서의 용도로는 충분한 감도를 나타낼 수 있는 activity 임을 확인하였다.

3.2 Avidin이 고정화된 HRP-SPCE의 성능 측정

사용된 센서의 가장 기본적인 구조인 HRP-SPCE와 첫 번째 고정화가 이루어진 avidin-HRP-SPCE의 성능 실험을 통하여 사용된 avidin의 농도와 고정화비에 대한 고찰을 수행하였다. 본 실험에서는 두 종류의 avidin이 사용되었다: Streptavidin(방법 I)과 deglycosylated avidin(방법 II). Fig. 2에 나타난 바와 같이 12.5 μM-100.0 μM 농도 범위의 H₂O₂ 용액(pH7.0, 50 mM PBS)에 대한 센서의 감응도를 측정하였다. 순수한 HRP-SPCE일 경우 전극의 감응도가 64 nAμM⁻¹cm⁻²로 나타났으며 avidin 이 들어있지 않은 blank buffer 로 avidin 고정화 단계와 동일한 처리를 한 전극은 각각 43 nAμM⁻¹cm⁻² (방법 I), 49 nAμM⁻¹cm⁻²(방법 II)로 나타내었다. 더불어 실제 avidin 용액으로 처리된 전극일 경우 각각 29 nAμM⁻¹cm⁻²(방법 I), 37 nAμM⁻¹cm⁻²(방법 II)로 나타내었다.

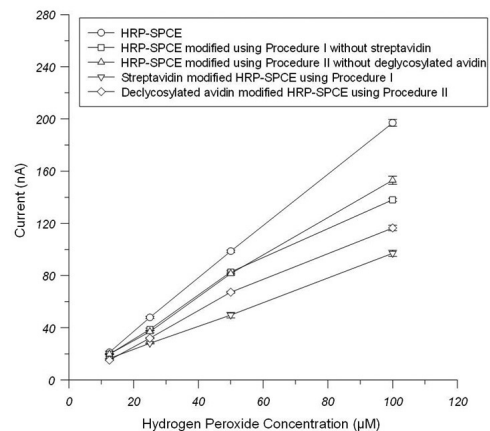


Fig. 2. HRP-SPCE response to hydrogen peroxide when modified with either streptavidin or deglycosylated avidin.

상기 실험에서 avidin고정화 과정에서 전극의 감응도가 약 40-50 % 정도의 감소가 일어남과 deglycosylated avidin 을 사용한 방법 II가 보다 효과적인 고정화 방법임을 확인하였다. 이와 같은 이유로 이후의 모든 실험에서는 방법 II를 기본 고정화 방법으로 사용하였다.

3.3 전기화학적 Glucose oxidase activity 측정

상기에서 기술한 바와 같이 avidin-biotin에 의한 항체 고정화의 최적조건을 확인하기 위하여 고정화 된 항체의 양에 따른 전극의 감도를 고찰하였다. Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 농도 범위 0.0 ngL⁻¹ - 250 ngL⁻¹의 biotin과 결합된 항체를 avidin 이 고정화된 HRP-SPCE 전극과 결합시킨 후 최적의 항체의 양을 측정하였다.

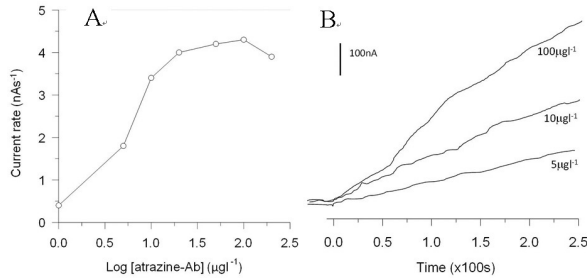


Fig. 3. Specific binding curve of the modified anti-herbicide antibody with pesticide glucose oxidase conjugate (A) and amperometric responses of the immunosensors to atrazine (B).

HRP-SPCE를 사용한 H₂O₂의 측정에서는 가해준 H₂O₂에 따른 즉각적인 전류의 변화를 확인 할 수 있었으나 항체가 고정화된 면역센서 경우에는 전류의 변화가 서서히 증가하는 경향을 나타내어 steady-state-전류의 변화가 아닌 단위시간에 변환된 전류(nAs⁻¹)를 측정하여 전류법에 의한 biotin과 결합된 항체의 양에 따른 전극의 시간-전류 감응곡선의 예를 Fig. 3B에 나타내었다. 또한 전극 표면이 아닌 bulk 상태의 용액내의 AGO(혹은 SGO)와 glucose와의 반응에서 생성되는 H₂O₂에 의한 센서의 오차를 제거하기 위하여 0.5 mgmL⁻¹ catalase를 용액 내에 잔류시켰다. Catalase의 효과적인 효소반응에 의해 bulk 용액 안의 H₂O₂는 제거되며 이 반응에 의하여 기존의 ELISA에서 수반되는 항체-항원 반응 후의 분리 및 세척과정이 불필요하게 되었다. 결과를 통하여 200 ngL⁻¹ 항체 고정화가 최적의 조건임을 확인하였고 이후의 모든 실험에서는 이 조건을 기본으로 하여 수행하였다.

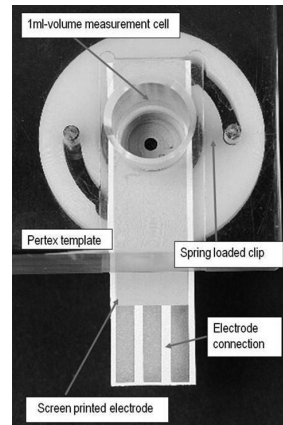


Fig. 4. Electrochemical cell set up incorporating Perspex template and SPCEs.

3.4 면역센서를 이용한 전기화학적 제초제 검출

제작된 면역센서를 이용하여 atrazine과 simazine에 대한 검출곡선을 구축하였다. 항체가 고정화 된 HRP-SPCE를 Fig. 4와 본 연구의 저자가 발표한 연구에서 설명한 바와 같이 센서 구동용 지지체에 장착한 후 potentiostat에 연결하였다 [10,11].

전극 장착 후 지지체 안의 1 mL-well 속으로 100 µL atrazine(혹은 simazine) 표준용액과 50 µL AGO(혹은SGO, 각각50 mgL⁻¹) 용액을 넣어준 후 효과적인 항원-항체 간 결합 반응을 약 10분간 수행하였다. 그 후 350 µL of a 1 % (w/v) glucose 와 0.5 mgmL⁻¹ catalase 가 포함된 PBS용액을 같은 well에 첨가하였다. Glucose 용액을 첨가한 직 후 센서에 +50 mV vs. Ag/AgCl 전위를 걸어준 후 약 5분간 전류의 변화 (nAs⁻¹)를 측정하였다. 분석하고자 하는 각각의 herbicide 표준용액과 AGO(또는 SGO) 내의 conjugate 간의 경쟁반응에 의하여 보다 높은 농도의 표준용액을 사용할수록 전극 표면에 결합할 수 있는 AGO(또는 SGO)의 양이 감소함에 따라 측정된 current rate의 감소함을 확인할 수 있었으며 제초제 atrazine 과 simazine 에 대한 면역센서의 검출곡선을 구축하였다(Fig. 5, 6). 검출곡선을 통하여 본 연구에 의하여 개발된 면역센서는 수 ppb 단위의 제초제 검출이 가능하였으며(3 ppb atrazine, 10 ppb simazine) 각 시료 검출에는 약 15분이 소요되었다. 비록 100 ppb 아래의 낮은 시료의 농도에 대해서는 30-40 % CV를 나타냈으나 100 ppb 이상의 농도에 대해서는 10 % 아래의 CV를 나타내어 우수한 재현성을 보였다. Atrazine 센서일 경우 100 pp이하의 샘플에 대해서는 우수한 직선성(atrazine: r²=0.97, Simazine: r²=0.94)을 나타냈으나 100 ppb 이상의 시료에 대해서는 센서의 감응도가 현저히 둔화됨을 확인 하였다. 감응도는 사용된 센서의 전극의 단위 면적 (cm²)과 단위농도(ngL⁻¹) 변화에 따른 신호의 변화량(nAs⁻¹)을

산출하여 계산하였다. 좀 더 효과적인 검증곡선의 직진성을 나타내기 위하여 각 결과에 대한 농도축(그래프의 x-축)을 log 함수로 나타내었으며 결과를 Fig. 5, 6의 inlet 그래프로 나타내었다. Atrazine 센서의 경우 직진성의 dynamic range 를 보이는 100 ppb 이하의 시료에 대해서 $3.5 \text{ nAs}^{-1} \text{ Lcm}^{-2}$ 의 감응도를 보였으며 simazine 센서의 경우 100 ppb 이하의 시료에 대하여 $4.4 \text{ nAs}^{-1} \text{ Lcm}^{-2}$ 의 감응도를 보였다.

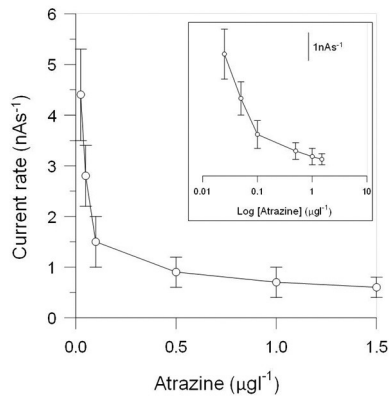


Fig. 5. Calibration curves for electrochemical atrazine measurement. Each point represents the mean value of 5 measurements and the error bars represent one standard deviation. Inlet: A calibration curve with Log function.

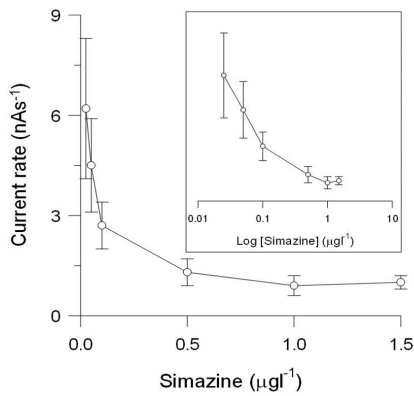


Fig. 6. Calibration curves for electrochemical simazine measurement. Each point represents the mean value of 5 measurements and the error bars represent one standard deviation. Inlet: A calibration curve with Log function.

4. 결 론

본 연구에서는 전류법을 이용한 신속한 제초제 검출을 위한 전기화학적 면역센서를 개발하였다. 센서의 전극을 제작하기 위하여 막프린트법을 이용하여 값싸게 제작할 수 있는 가능성을 확인하였다. 또한 기존의 ELISA와 같은 면역검출법에서 glucose oxidase labeling 에 의하여 발생하는 과산화수소의

제거를 위한 분리 및 세척 과정을 생략할 수 있도록 bulk시료 내에서 과산화수소의 효과적인 제거를 효소를 사용하여 수행하였다. 그러나 센서 표면에서 고정화된 항체와 시료인 항원 사이의 면역적 결합에 의하여 발생하는 과산화수소의 성공적인 전기화학적 검출을 통하여 시료인 ppb 단위의 제초제를 검출하였다. 국제적으로 음료수 등의 식품 내에 잔류하는 제초제의 총량을 100 ppb MAC(Maximum Admissible Concentrations)으로 규제하고 있으며 권장하는 RAC(Recommend Admissible Concentrations)을 10 ppb 이하로 나타내고 있다[14,15]. 최근 발표된 참고자료[14]에 따르면 atrazine 및 simazine 등의 herbicide 의 농도를 분광학적인 방법 또는 ELISA법 등을 사용하면 0.01 ppb 이하의 농도도 검출이 가능함을 나타내고 있다. 본 연구에서 개발한 센서의 검출한계가 비록 상기 방법에 비하여 높은 값을 나타내었으나(3 ppb atrazine, 10 ppb simazine) MAC 검출용 센서의 용도로의 사용에는 충분한 가능성을 나타내었으며 본 센서의 총 검출 시간은 15분으로 다중채널 potentiostat과 연계하면 10여개의 시료를 20-30분 안에 검출, 분석이 가능할 수 있음을 확인하였으며 휴대용 potentiostat를 활용하면 in-field, on-site 검출이 가능한 분석시스템으로의 활용가능성을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유 과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- [1] S. Schuman and W. Simpson, "A clinical historical overview of pesticide health issues", *Occup. Med.*, vol. 12, pp. 203-207, 1997.
- [2] B. Johnson, "A review of health-based comparative risk assessments in the United States", *Rev. Environ. Health*, vol. 15, pp. 273-287, 2000.
- [3] P. Hansen and A. Usedom, "New biosensors for environmental analysis", *EXS.*, vol. 81, pp. 109-120, 1997.
- [4] I. Karube, K. Yano, S. Sasaki, Y. Nomura, and K. Ikebukuro, "Biosensors for environmental monitoring", *Ann. NY Acad. Sci.*, vol. 864, pp. 23-36, 1998.
- [5] A. Warsinke, A. Benkert, and F. W. Scheller, "Electrochemical immunoassays", *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 366, pp. 622-634, 2000.
- [6] R. Scheller¹, U. Wollenberger, A. Warsinke and F. Lisdat,

- “Research and development in biosensors”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 12, pp. 35-40, 2001.
- [7] D. Park, Y. Shim and S. Chang, “Tri-enzyme modified electrochemical biosensor for paracetamol detection”, *J. Kor. Sensors Soc.*, vol. 17, no. 1, pp. 29-34, 2008.
- [8] S. Kroger, P. F. Turner, K. Mosbach, and K. Haupt, “Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen-printed electrodes”, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 3698-3702, 1999.
- [9] T. Neufeld, I. Eshkenazi, E. Cohen, and J. Rishpon*, “A micro flow injection electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides”, *Biosens. Bioelectr.*, vol. 15, pp. 323-329, 2000.
- [10] S. Chang, K. Rawson, and C. McNeil, “Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols”, *Biosens. Bioelectr.*, vol. 17, pp. 1015-1023, 2002.
- [11] S. Chang and D. Park, “ Disposable in-field electrochemical potable sensor system for free available chlorine (FAC) detection”, *J. Kor. Sensors Soc.*, vol. 16, no. 6, pp. 449-456, 2007.
- [12] B. Dzantiev, E. Yazynina, A. Zherdev, Y. Plekhanova, A. Reshetilov, S. Chang, and C. McNeil, “Determination of the herbicide chlorsulfuron by amperometric sensor based on separation-free bienzyme immunoassay”. *Sens. Actuat. B.*, vol. 98, pp. 254-261, 2004.
- [13] Z. Marshall and Rhodes. C. T., “Modification of trinder's method for the assay of salicylates in biological fluids”, *Clinic. Chimica Acta*, vol. 54, pp. 135-136, 1974.
- [14] AOAC, Association of Agricultural Chemists official method 974.27, “Official methods of analysis of AOAC international”, *18th Ed.*, AOAC, Arlington, USA, 2010.
- [15] 80/778/EEC, Council directive relating to the quality of water intended for human consumption, *Official J. of the E.C.*, L 229/11-23, 1980.



장승철(Seung-Chul Jang)

- 1994년 2월 동국대학교 화학과(이학사)
- 2000년 5월 영국 뉴캐슬대학교 의대 의생화학과(이학박사)
- 1999년 6월~2007년 2월 뉴캐슬대학교 의대 의생화학과 선임/책임연구원
- 2002년 1월~2004년 12월 뉴캐슬대학교 나노기술연구소 연구원
- 2007년 3월~현재 부산대학교 바이오피지오센서기술연구소 조교수
- 주관심분야 : 바이오센서, 면역센서, Cell-Chip 및 BioMEMS 센서시스템