

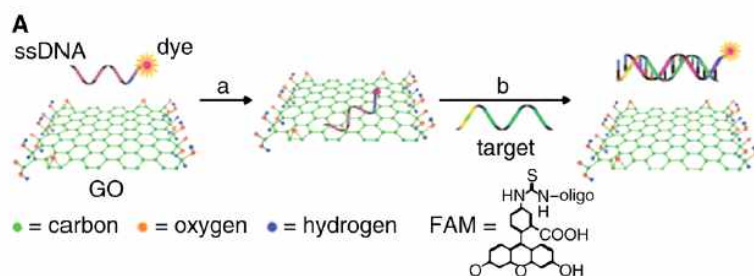
Graphene의 최신 연구동향 6

Graphene-Based Enzymatic Sensors[1]

생물계에서 직접 전자 이동(direct electron transfer; DET)은 생화학·생물리학 분야에서 매우 중요한 현상이다[2]. 이런 현상을 이용해 단백질의 구조 분석, 효소 분자들의 산화환원 반응의 매커니즘과 열역학 등에 대한 연구들이 진행되고 있다. 효소의 직접 전기화학(direct electrochemistry)이란 전극과 효소의 활성 중심 사이의 직접적인 전자의 소통(전자의 흐름)을 말한다. 이 때 매개체나 다른 반응물들은 참여하지 않기 때문에 바이오센서, 바이오 연료전지, 바이오의학 장치를 개발하는데 매우 유용하다[3]. 그러나 산화환원 직접 전기화학의 실현은 일반 전극들에서는 매우 어렵다. 이유는 대부분의 효소 활성 사이트들이 분자의 소수성 공간 깊은 곳에 존재하기 때문이다. 또한, 보고된 센서들은 대부분 전극에 고정된 효소들이 오랜 시간 동안 활성을 유지하기가 어려워 전극의 안정도와 감도가 시간에 따라 감소한다. 이러한 것을 극복하고자 매우 큰 표면적을 가지고 효소와 전극 사이의 전자의 흐름을 증가시킨 탄소나노튜브나 그래핀을 이용한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 특히 그래핀의 경우에는 작은 전기적 노이즈를 갖고 있고 효소 끝에 있는 자유-NH₂ 들과 반응하여 amide 공유결합을 할 수 있는 풍부한 기능기들이 존재하기 때문에 고감도의 센서를 제조하는 것이 가능하다. 여기서는 그래핀을 이용하여 보고된 결과들을 살펴보자.

1. Thrombin Sensor[4]

수용성의 산화 그래핀(graphene oxide; GO)을 이용하여 thrombin을 검출한 것을 살펴보자. 아래의 그림은 DNA 및 단백질 검출에 사용될 수 있는 새로운 platform을 보여주는 개략도이다. a 과정에서 GO와 dye-ssDNA가 강한 비공유 결합에 의하여 결합하면서 형광 세기가 감소하게 된다. 여기에 타겟 DNA가 결합하게 되면 GO에서 dye-ssDNA가 떨어져 나오면서 형광이 세기가 복원되는 것을 b 과정에서 알 수 있다. 여기서 사용된 dye는 FAM (fluorescein-based dye)이고, dye-ssDNA는 5' -AGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGC-FAM-3' 이다[5].



위의 플랫폼이 human thrombin 검출에 응용 가능한지 확인하기 위하여 human thrombin aptamer 5' -TCTCTCAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-FAM-3' 을 이용해서 분석한 결과가 아래 그림이다. B 그림은 human thrombin의 농도가 증가함에 따라 형광의 세기가 증가하는 형광 스펙트라를 보여준다. 즉, GO에 고정되었던 aptamer가 human thrombin 농도가 증가함에 따라 단백질과 결합하여 GO로부터 탈착함으로써 형광의 세기가 증가하여 100 nM인 경우에 약 5배 정도의 값을 나타낸다.

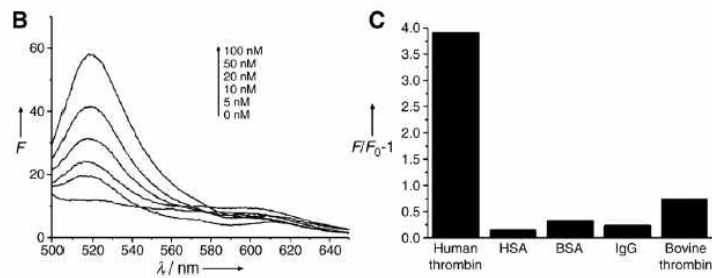
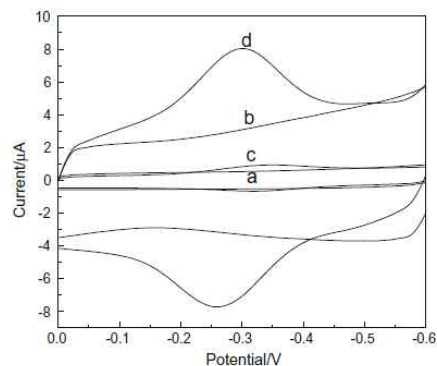


그림 C는 사용된 aptamer가 human thrombin에만 선택성을 가진다는 것을 확인한 결과이다. 사용된 단백질들은 HSA(human serum albumin), BSA(bovine serum albumin), human IgG, bovine thrombin으로써 농도는 모두 100 nM였다. Dye-labeled aptamer-GO 시스템이 여러 단백질 중에서 human thrombin만을 선택적으로 검출할 수 있음을 보여주고 있다.

2. Cytochrom c Sensor[6]

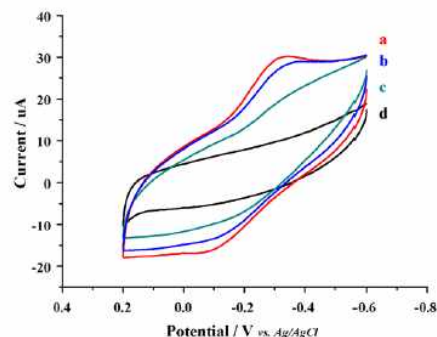
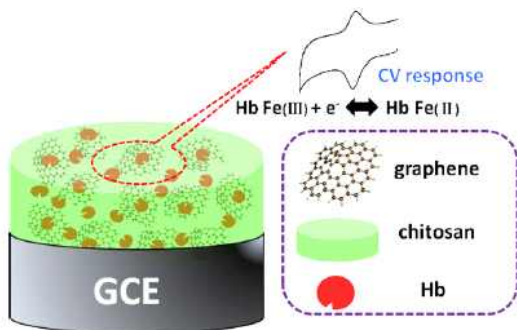
Cytochrom c (Cyt-c)와 전극 사이의 DET는 생물학적 기능들 때문에 많은 연구가 진행되고 있다. Glass carbon (GC) 전극을 이용한 Cyt-c 검출은 매우 낮은 ET 매커니즘 때문에 검출이 어렵다[1]. 이러한 단점을 극복하고자 chitosan-graphene (CS-GR) modified 전극을 이용한 Cyt-c 검출이 보고되었다[6]. 그래핀을 수용액 상에서 분산시키기 위한 분산제로 사용된 chitosan은 생적합성, 생분해성, 무독성, 매우 강한 기계적 강도를 가지고 있어서 효소 또는 바이오 분자들의 고정화를 위하여 많이 사용되고 있다.



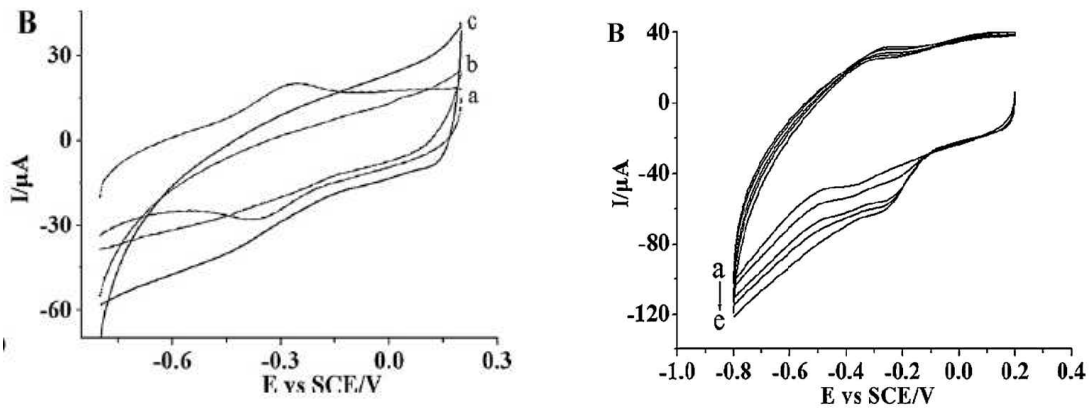
위의 그림은 CS-GR-GC 전극을 이용하여 Cyt-c(1 mg/mL)을 검출한 것으로 PBS (pH 7.0) 용액에서 측정된 전형적인 cyclic voltammograms(CVs) 결과이다. 그림 a와 b는 bare GC와 CS-GR/GC 전극의 CV 결과이다. 조사된 전위 창에서 아무런 CV 응답을 측정할 수 없다. 그래핀이 없는 Cyt c/CS/GC 전극에서는 redox peaks가 명확하게 보이지 않는다(그림 c). 그림 d는 CS-GR/GC 전극에 Cyt-c를 도입한 것으로 Cyt c의 산화 환원에 일치하는 명확한 redox peaks들을 볼 수 있고 anodic peak potential이 -0.28V 로 측정되었다. 그림 c와 비교했을 때 그래핀이 존재함으로써 전극과 Cyt-c 사이의 DET를 증가시켰음을 알 수 있다. 또한, 측정된 Cyt-c의 ET 속도 상수가 1.95 s^{-1} 로 이 값은 다른 NaY zeolite($0.78 \pm 0.04\text{ s}^{-1}$)[24]나 GNPs/CS/MWNTs (0.97 s^{-1})을 사용한 전극보다 크기 때문에 더 우수한 시스템이라 할 수 있다.

3. Hemoglobin(Hb) Sensor[7]

Hb는 혈액의 가장 중요한 부위로서 순환계를 통한 산소 운반의 책임을 지고 있다. 혈액에서 Hb 농도의 변화는 몇몇 질병들을 야기하며 심한 경우에는 사망에 이를 수도 있다. 그러므로 혈액의 정확한 Hb 농도 측정은 매우 중요하다[1]. 다음 그림은 Chitosan(CS)-graphene(GR)-modified glassy carbon(GC) 전극을 이용하여 Hb를 검출한 결과이다. 왼쪽 그림은 Hb를 검출하기 위한 센서를 제작하는 개략도를 보여 준다. GC 전극 위에 키토산과 그래핀을 고정화 시킨 후에 Hb이 존재할 때 Hb Fe(III)가 전자 하나를 받아서 Hb Fe(II)로 변화는 과정에서 CV 응답을 측정할 수 있다. 오른쪽 그림은 CS-GR/GC 전극(그림 a)과 다른 전극들(Hb-CS/GCE(그림 b), CS-GR/GCE(그림 c), Hb-GR/GCE(그림 d))을 비교한 CV 결과들이다. 즉, 그래핀이 없을 때, Hb이 없을 때, 키토산이 없을 때를 비교한 것이다. 센싱 계면에 존재하는 그래핀은 매트릭스와 Hb의 사이의 전자 전달을 효과적으로 가속화 시키는 역할을 함으로써 더 빠른 전류 응답을 보여준다. 게다가 Hb-graphene-chitosan/GCE 전극에서 전류 응답이 $30\sim 150\text{ mV s}^{-1}$ 스캔 속도에서 직선으로 증가함을 알 수 있는데 이러한 과정이 표면 제어 전기화학 공정(surface-controlled electrochemical process)임을 보여준다. 특히, 키토산-그래핀 필름은 전기신호 변화의 역할 뿐이 아니라 바이오 분자들이 그들의 활성을 유지하기 위한 대피소를 제공해 준다.

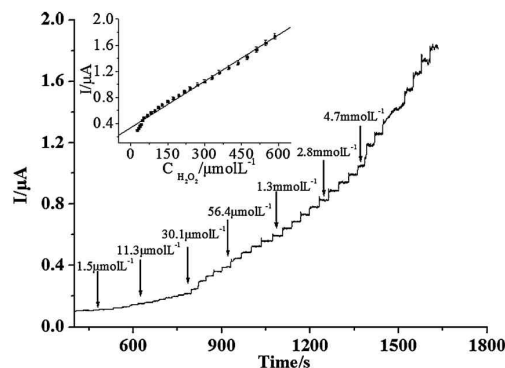


간단한 화학 침전법과 hydrazine 이용한 화학 환원을 이용하여 magnetite-graphene($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-GE}$)이 제작되었다[8]. 이를 이용하여 Hb 검출과 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-GE}$ 에 고정화된 Hb을 이용하여 과산화수소(H_2O_2)를 검출한 결과를 살펴보자. 왼쪽 그림은 Hb- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-GE/CCE}$ (carbon ceramic electrode) (a), bare CCE (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-GE/CCE}$ 에서의 CV 값을 보여주고 있다. 스캔 속도가 100 mV/s인 PBS 용액(0.1 mol/L, pH 7.0)에서 Hb이 존재할 경우에 명확하게 redox peaks($E_{pa}=-0.285\text{V}$, $E_{pc}=-0.363\text{V}$)들을 볼 수 있다.



오른쪽 그림은 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-GE}$ 에 고정화된 Hb에 과산화수소의 농도를 변화시키면서 측정한 결과를 보여준다. a~e는 과산화수소의 농도가 0, 15.0, 45.0, 60.0, 75.0 mol/L H_2O_2 일 때 CV 값들이다. PBS 용액에 과산화수소를 첨가했을 때 환원 피크의 증가와 산화 피크의 감소는 Hb- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-GE}$ composite에 존재하는 Hb에 의한 과산화수소의 전형적인 전기촉매 환원 과정을 보여준다.

다음 그림은 과산화수소의 농도를 변화시키면서 전류를 측정된 결과를 보여준다. 이 센서는 빠른 반응 시간(<3 s)을 갖고 있으며 작은 그림에서 알 수 있듯이 넓은 농도 영역(1.50 ~ 585 $\mu\text{mol/L}$)에서 직선 경향을 보여주었다. 검출 한계는 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ($S/N = 3$)로 다른 시스템과 비교해서 우수함을 알 수 있었다. 또한, 좋은 재현성을 나타내었으며 오랜 시간 동안 안정성을 보여서 실제적인 분석에 적용할 수 있는 시스템으로 평가된다.



References

- [1] T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A. K. Mishra, N. H. Kim, and J. H. Lee, "Recent advances in graphene-based biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4637, 2009.
- [2] T. Gan and S. Hu, "Electrochemical sensors based on graphene materials," *Microchim Acta*, 175, 1, 2011.
- [3] Y. Shai, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I. A. Aksay, and Y. Lin, "Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review," *Electroanalysis*, 22, 1027, 2010.
- [4] C.-H. Lu, H.-H. Yang, C.-L. Zhu, X. Chen, G.-N. Chen, "A graphene platform for sensing biomolecules," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 4785, 2009.
- [5] M. S. Artiles, C. S. Rout, and T. S. Fisher, "Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing," *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 1352, 2011.
- [6] J. F. Wu, M. Q. Xu, and G. C. Zhao, "Graphene-based modified electrode for the direct electron transfer of Cytochrome c and biosensing," *Electrochem. Commun.*, 12, 175, 2010.
- [7] H. Xu, H. Dai, and G. Chen, "Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin protein entrapped in graphene and chitosan composite film," *Talanta*, 81, 334, 2010.
- [8] Y. He, Q. Sheng, J. Zheng, M. Wang, and B. Liu, "Magnetite-graphene for the direct electrochemistry of hemoglobin and its biosensing application," *Electrochim. Acta*, 56, 2471, 2011.