

소변에서 방광암 바이오마커 검출을 위한 전기화학식 바이오센서의 측정방법

Detection Method of a Electrochemical Biosensor for a Bladder
Cancer Biomarker in Urine

성우경 · 송성아 · 김영주 · 이국녕 | Woo Kyeong Seong · Sunga Song · Young-Ju Kim · Kook-Nyung Lee

Korea Electronics Technology Institute, 25 Saenari-ro, Seongnam-Si, Gyeonggi-do 13509, Korea
E-mail: seong@keti.re.kr

1. 서론

방광암은 다른 암에 비교하여 치료 후 재발 가능성이 높으므로 수술 후 정기적인 재검사가 필요하다.^{1,2} 현재 사용되고 있는 방광경 검사는 시술 비용이 비싸며, 방법이 침습적이어서 환자에게 고통을 줄 수 있다는 한계가 있다.^{3,4} 이러한 한계를 극복하기 위해서 POCT(point-of-care testing) 현장진단을 위한 측정이 간편하고 비침습적인 전기화학식 바이오센서의 개발이 요구되고 있다. 상대적으로 크기가 크고 비싼 광학 모듈이 필요한 광학 방식과 비교하여 전기화학 방식은 가격이 저렴하고 사용이 편리하면서 크기가 작아 휴대용 제작이 용이하기 때문에 POCT 현장진단용 진단 플랫폼을 위한 바이오센서로서 매우 유망하다.⁵ 방광암을 진단하기 위한 바이오 마커들을 비침습적으로 배뇨에서 검사하는 진단기에 적용하기 위한 효소 기반 전기화학식 바이오센서를 개발하였다. 전기화학식 바이오센서를 POCT 현장진단기에 성공적으로 적용하기 위해서는 정확도, 재현성의 성능을 확보하면서 사용자 편의성이 우수한 측정프로토콜을 개발해야 한다. 본 총설에서는 방광암 검사 측정프로토콜의 개발을 위한 전기화학식 바이오센서에서 발생하는 화학반응과 반응속도, 속도결정단계 등의 연구에 대해 소개하고자 한다.

2. 본론

2.1 방광암 바이오 마커 검출용 전기화학식 바이오센서

전기화학식 바이오센서는 항원-항체 반응을 이용하여 바이오 마커를 검출하는데 유용하게 활용되고 있다. 특히 효소촉매 반응을 기반으로 한 바이오센서는 효소와 전극, 기질을 어느 것으로 선택하느냐에 따라서 성능과

Author



성우경

1990 서울대학교 무기재료공학과 (학사)
1992 서울대학교 무기재료공학과 (석사)
2001 아주대학교 분자과학기술학과 (박사)
2002-현재 전자부품연구원 수석연구원



김영주

2006 상명대학교 생명과학과 (학사)
2009 가톨릭대학교 생명과학과 (석사)
2016-현재 전자부품연구원 연구원



송성아

2015 송실대학교 화학과 (학사)
2018 송실대학교 정보통신소재·융합학과 (석사)
2016-현재 전자부품연구원 연구원

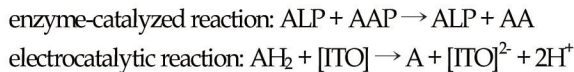


이국녕

1998 서울대학교 전기컴퓨터공학부 (학사)
2000 서울대학교 전기컴퓨터공학부 (석사)
2003 서울대학교 전기컴퓨터공학부 (박사)
2005-현재 전자부품연구원 수석연구원

특성이 달라진다. 본 연구에서는 방광암 바이오 마커인 MMP9 (Matrix metalloproteinase 9), NMP22(Nuclear Matrix Protein Number 22), ApoA1(apolipoprotein A1) 등을 검출하기 위해서 ITO(Indium Tin Oxide) 전극을 사용하고 효소와 기질로 ALP(alkaline phosphatase)와 AAP(ascorbic acid 2-phosphate)를 선택하였다. ITO 전극은 금 전극과 비교하여 AAP가 높은 전압에서 반응을 하므로 AA(ascorbic acid) 산화반응 전압 영역에서 배경잡음 대비 높은 신호 값을 상대적으로 쉽게 얻을 수 있으므로 이러한 조합을 선택하였다.⁶

항원-항체 반응으로 ALP가 고정화된 ITO 전극을 AAP 기질 용액에 담그고 특정 전압을 걸어주면 효소촉매 반응과 전기촉매 반응의 두 가지가 아래의 반응식으로 순차적으로 일어난다. ALP에 의한 효소촉매 반응은 ALP는 변하지 않으면서 AAP를 AA로 바꾸어준다. 그리고 Ag/AgCl 기준전극에서 0.2 V 이상의 전압을 전극에 걸어주면 인듐산화물의 전기촉매 반응으로 AA(=AH₂)를 산화시켜서 A(dehydroascorbic acid)와 수소 이온을 생성하고 두 개의 전자를 전극에 전달한다. 이 때 발생한 전자에 의한 전류는 ALP의 양에 비례하므로, 바이오 마커의 농도에 의해서 이 ALP의 양이 결정되게 하여 바이오센서로 사용할 수 있다.



2.2 ITO 전극에서 ALP 효소촉매 반응

효소의 활성도에 따라서 효소 반응 속도가 다르게 나타나며 일반적으로 효소반응 속도는 미카엘리스-멘텐방정식(Michaelis-Menten equation)에 의해서 잘 설명될 수 있다. 기질 농도에 따른 효소의 초기 반응 속도는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$E + S \xrightleftharpoons[k_r]{k_f} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

[S] : 기질(반응물, Substrate) S의 농도,
 [E] : 효소(Enzyme) E의 농도,
 [ES] : 효소-기질 복합체의 농도(Substrate-Enzyme complex),
 [P] : 생성물(Product)의 농도,
 V_{max} : 최대 반응속도 상수,
 K_M : 미카엘 상수.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

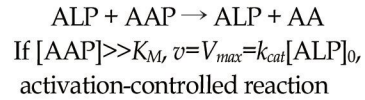
$$:K_M = \frac{k_r + k_{cat}}{k_f} \quad V_{max} = k_{cat}[E]_0$$

위 관계에서 보듯이 효소촉매 반응의 속도는 기질 농도에 따라서 변한다. 기질 농도가 매우 작은 범위에서는 반응속도가 기질 농도에 선형적으로 비례하다가 기질 농도가 매우 커지면 최대속도에 접근한다. 즉, $[S] \gg K_M$ 이면 반응속도 $v = V_{max} = k_{cat}[E]_0$ 가 되고 activation-controlled reaction이 된다. 반대로 $[S] \ll K_M$ 이면 $v = V_{max}[S]/K_M$ 이 되어 diffusion-controlled reaction으로 설명된다. 여기서 미카엘 상수 K_M 은 반응속도가 최대속도 V_{max} 의 반일 때의 기질농도로 정의된다.

2.3 ALP 전극의 효소촉매 반응속도

ALP가 고정화된 ITO 전극을 AAP 기질 용액에 담그면

어떤 일이 일어날까? 우선 효소인 ALP가 기질 AAP와 만나서 자기는 변하지 않고 생성물인 AA를 만들어 내며 이와 같은 반응을 효소촉매 반응이라 한다. 우리가 제작한 전극에서는 ALP가 전극 표면에 이차원적으로 고정화되어 있으므로 이 반응은 전극 표면 근처에서 아마 수십 nm 거리 이내에서 일어날 것으로 생각된다. 또한 충분한 농도의 AAP 기질 용액을 사용하면 앞에서 언급한 미카엘리스-멘텐방정식을 이용하여 효소촉매 반응은 다음과 같이 표현된다.



이 반응속도식에서 알 수 있듯이 높은 AAP 농도에서는 AA를 생성하는 반응속도가 표면에 고정화된 ALP의 양, 즉 $[ALP]_0$ 가 일정하므로 k_{cat} 에 의해서 결정된다. 이 k_{cat} 는 효소 촉매 활성도에 의해서 결정되며 촉매반응 온도에 영향을 받을 것이라 생각된다. 이를 확인하기 위해서 촉매반응 온도를 변수로 하여 반응속도 실험을 수행하였고 그 결과를 그림 1에 나타내었다.

위 반응속도 실험에서 순환전압전류법(cyclic voltammetry, CV)의 측정조건은 ITO 전극면적이 28 mm^2 이고 스캔속도는 느린 0.02 V/s 이다. 이 정도의 조건에서는 효소촉매반응으로 생성되는 AA가 다음 단계의 전기촉매반응에 의해서 즉시 산화되어 전자를 발생할 것으로 생각된다. 즉, 전체 반응속도를 결정하는 속도결정단계(rate determining step)를 효소촉매반응으로 가정하면 측정된 전류 값은 효소촉매 반응속도에 비례한다.

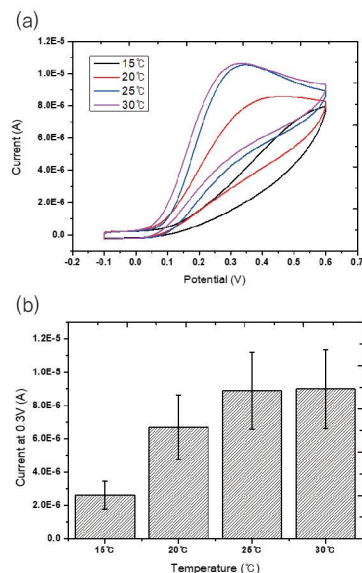


그림 1. ALP가 고정화된 ITO 전극의 반응온도에 따른 효소촉매 반응속도: (a) 반응온도 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C의 순환전압전류 그래프(스캔속도 0.02 V/s, Ag/AgCl 기준전극), (b) 그림 2a에서 측정된 그래프의 0.3 V에서 전류값 비교.

따라서 실험결과로 측정된 전류 값이 온도에 비례하여 커지므로 제작된 ALP-ITO 전극은 촉매반응 온도에 영향을 받는 activation-controlled reaction이라 판단된다. 특이한 점은 25 °C까지는 효소촉매 반응속도가 빨라지지만 그 이상에서는 더 이상 변하지 않음을 알 수 있다. 이 측정 데이터는 진단기기 개발 시 사용자가 25 °C 실온 이상에서 바이오 마커를 검사하는 것이 바람직하다고 알려준다.

지금까지 효소촉매 반응속도, $v = V_{max} = k_{cat}[ALP]_0$ 를 결정하는 인자 중에서 k_{cat} 을 확인하였고 다음 인자로 $[ALP]_0$ 를 실험을 통해서 검증하고자 하였다. $[ALP]_0$ 는 ITO 전극에 Avidin-Biotin 결합으로 고정화시킨 효소 ALP의 양이다. 우리는 이 고정화시킨 ALP 양을 정확하게 측정하기는 어려우므로 고정화 반응 시 사용한 Biotin-ALP의 농도에 변화를 주었다. 즉, 이 농도를 증가함에 따라서 ITO 전극에 고정화되는 ALP의 양도 증가하기 때문이다. $[ALP]_0$ 에 의한 효소촉매 반응속도의 변화를 관찰하기 위해서, Biotin-ALP의 농도를 0, 1, 10 µg/mL의 세 가지 조건으로 변화시키면서 시간전류법(chronoamperometry, CA)으로 측정한 실험결과는 그림 2와 같다.

시간전류법으로 측정된 전류 값이 약 30초 이후에 안정화 되고, 그 안정화된 값은 농도가 커짐에 따라서 증가하는 실험 결과를 얻었다. 이 결과로부터 효소촉매 반응은 예측했던 대로 $[ALP]_0$ 에 반응속도가 비례하고 activation-controlled reaction임을 확인하였다. 그런데 여기서 더 흥미로운 결과는 측정 초기에 큰 전류 값을 보이다가 점점 작아지고 어느 정도 시간이 지나면 일정한 값을 계속 유지한다는 것이다. 앞에서 전체 반응의 속도결정단계가 효소촉매반응이라 가정하였는데 이 실험결과는 약 30초 이후의 반응에서는 이 가정이 맞지만 측정 초기에서는 그렇지 않음을 보여준다. 30초까지의 측정 초기에는 효소촉매 반응의 다음 단계인 전기촉매반응이 속도를 결정한다고 생각된다.

ALP가 고정화된 ITO 전극을 AAP 기질 용액에 담그는 순간 어떤 일이 일어나는지 생각해보았다. 우선 ALP가 기질 AAP를 반응시켜 AA를 계속 생성하여 ITO 전극 표면에 쌓을 것이다. 이 때 전극에 전압을 걸어주지 않으면 전기촉매반응이 일어나지 않으므로 ITO 전극에는 AA가 포화될 때까지 최대한 많이 쌓일 것으로 추측된다. 그 후 전극에 전압을 걸

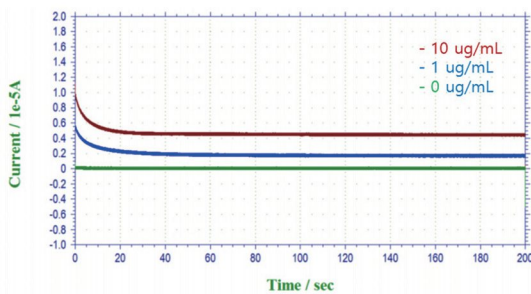


그림 2. Biotin-ALP 농도 0, 1, 10 µg/mL의 시간전류법 그래프(측정전압 0.45 V, Ag/AgCl 기준전극).

어주는 순간부터 표면에 쌓인 AA는 감소하고 전체 반응은 안정화된다고 생각한다. 이를 실험으로 확인하기 위해서 전극에 전압을 인가하지 않고 AAP 기질 용액에 담가두는 시간을 변수로 하여 시간전류법으로 전류 값의 변화를 측정하였다. 이 때 작업전극과 상대전극 사이에 걸어준 전압은 Ag/AgCl 기준전극에서 0.45 V이었다.

그림 3은 전압을 인가하지 않고 담가두는 시간을 5초에서 7분까지 변화시키면서 측정한 시간전류법의 전류 값을 보여준다. 이 실험결과로부터 반응속도는 이 담가둔 시간이 2분까지는 시간에 비례하여 증가하고 약 2분 이후에는 변하지 않음을 알 수 있다. 즉, ITO 전극 표면에 생성되는 AA가 2분 정도의 시간에 포화되어 최댓값에 도달한다고 판단된다. 이 실험 결과는 바이오 마커를 검사하는 체외진단기기 개발에 중요한 의미를 제공한다. 체외진단기기의 검사 정확도를 높이기 위해서는 측정 시 전압 인가 없이 기질용액에 담가두는 시간을 일정하게 하거나 2분 이상의 충분한 시간을 주어야 한다.

2.4 ITO 전극의 전기촉매 반응속도

ALP가 고정화된 ITO 전극의 전체 반응에 대한 속도결정 단계는 효소촉매반응이므로, 바이오 마커의 양에 비례해서 전극표면에 고정화되는 ALP 양이 증가하게 하면 효소촉매 반응속도를 결정하는 ALP의 양에 비례하여 생성되는 AA 농도도 바이오 마커의 양에 비례하게 된다. 그러면 이를 이용하여 AA를 산화시키는 전기촉매 반응으로 전자를 발생시켜 바이오 마커 농도를 정량하는 전기화학식 바이오센서를 만들 수 있다. 즉, 바이오 마커 농도에 따라서 ALP의 양, AA(=AH₂)의 양, 전자의 양이 순차적으로 비례하게 된다. 여기서 AH₂를 A(dehydroascorbic acid)로 산화시키는 반응이 전기촉매 반응이고 그 반응식은 다음과 같다.⁷

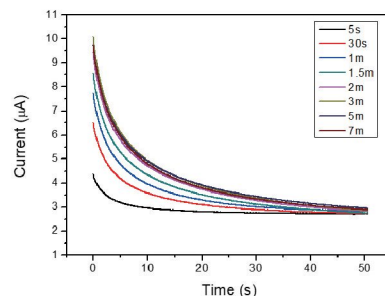
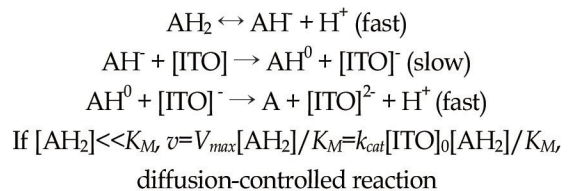


그림 3. 담가둔 시간 5 s, 30 s, 1 min, 1.5 min, 2 min, 3 min, 5 min, 7 min에 따른 ALP 효소의 AA 산화 반응에 대한 시간전류법 그래프(AAP 농도 1 mM, 측정전압 0.45 V).

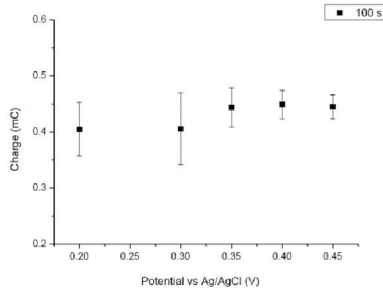


그림 4. ITO 전극에서 전압에 따른 전기촉매 반응속도(시간전하법으로 측정된 100 S 전하량, Ag/AgCl 기준전극).

전기촉매 반응도 효소촉매 반응과 같이 미카엘리스-멘텐 방정식을 적용하고 ALP에 의해서 생성되는 AH_2 의 농도가 작다고 가정하면 diffusion-controlled reaction이라 생각할 수 있다. 그러면 전기촉매 반응속도는 전극촉매 활성도와 AH_2 의 농도에 의해서 결정된다. 앞서 언급하였듯이 AH_2 의 농도는 ALP의 양에 의해서 결정되므로, 앞의 실험에서 ALP 양에 따라서 AH_2 의 농도와 반응속도가 비례함을 확인하였다.

전극촉매 활성도는 금, 탄소, ITO 등 어떤 전극재료를 사용하고 그 형상이 박막이냐 나노입자냐에 따라서 변한다.⁸ 또한 전기촉매이므로 걸어주는 전압이 커지면 촉매활성도 좋아지고 반응속도도 증가한다. 실제 제작한 ITO 전극에서 전압에 따른 전기촉매 반응속도를 실험하였고 그 결과를 그림 4에 나타내었다.

실험결과로부터 전기촉매 반응은 인가한 전압이 0.2 V 이상에서 반응이 활발하게 일어남을 확인하였다. 0.2 V 이상의 전압에서 전압이 증가함에 따라서 약간 증가하였으나 명확하지 않으므로 향후 0.2 V 이하의 전압을 포함하여 추가적인 실험을 수행하는 것이 필요하다. 이 결과로부터 전기화학식 바이오센서로 ALP 효소와 ITO 전극을 사용할 때는 측정전압을 0.35 ~ 0.45 V 사이로 하는 것이 적합하다.

ALP-ITO 전극을 1 mM AH_2 농도조건에서 반응온도에 따른 전기촉매 반응 속도 변화는 그림 5와 같다. 전기촉매 반응이 AH_2 의 농도가 작아 diffusion-controlled reaction이라 가정하면 반응속도가 온도에 따라서 변하지 않아야 한다. 실험결과는 반응속도가 측정온도에 따라서 약간 증가하므로 예측과는 다르다. AH_2 농도에 따른 반응속도의 변화에 대한 실험으로도 diffusion-controlled reaction 여부를 검증할 수 있으므로 이와 관련된 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 이 반응온도 실험결과는 ALP-ITO 전극의 전기촉매 반응이 25 ~ 30 °C 온도 범위에서도 활발히 일어남을 보여주었다. 그러므로 이 전극은 바이오센서에 적용 시 실온 측정으로 사용 가능성을 확인하였다.

3. 결론

ALP 효소 기반 전기화학식 바이오센서의 ITO 전극에서는 효소촉매 반응과 전기촉매 반응의 두 가지가 연속적으로

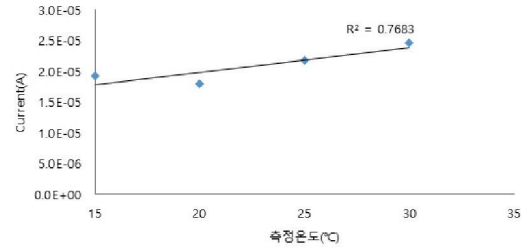


그림 5. ALP-ITO 전극을 1 mM AH_2 농도조건에서 반응온도에 따른 전기촉매 반응 속도 변화(측정전압 0.45 V, Ag/AgCl 기준전극).

일어난다. 전체 반응의 속도를 결정하는 속도결정단계는 효소촉매 반응단계임을 확인하였다.

효소촉매 반응속도에 영향을 주는 주요한 인자는 효소촉매 반응온도와 효소 ALP의 농도이었다. 효소촉매 반응온도는 25 °C 까지는 온도에 비례하여 반응속도가 증가하였고 25 °C 이상에서는 거의 변하지 않았다. 효소 ALP의 농도가 증가함에 따라서 반응속도도 커짐을 확인하였다.

특히, 전압을 인가하지 않은 전극을 AAP 기질 용액에 담그면 담가둔 시간에 비례하여 ITO 전극 표면에 AA가 축적됨을 알 수 있었다. 축적된 AA 양은 약 2분까지는 계속 증가하다가 그 시간이 지나면 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다. 그러므로 제작된 ALP-ITO 전극을 전기화학식 바이오센서로 활용 시 2분 이상 안정화시킨 후에 측정하는 것이 바람직하다.

ALP-ITO 전극 반응속도에 대한 연구결과인 적합한 측정온도와 측정시간을 방광암 검사 측정 프로토콜에 적용하였다. 이 측정 프로토콜을 이용하면 방광암 바이오마커 검사를 위한 전기화학식 바이오센서에서 정확도, 재현성 등의 성능을 향상시킬 것으로 기대한다.

감사의 글

본 총설 논문은 과학기술정보통신부 한국연구재단 바이오의료기술개발사업의 지원을 받아 작성되었습니다(NRF-2015 M3A9E2028480).

참고문헌

1. J. B. Shah, D. J. McConkey, and C. P. Dinney, *Clini. Cancer Res.*, **17**, 2608 (2011).
2. K. N. Rayn, G. R. Hale, G. P. Grave, and P. K. Agarwal, *Indian J. Urol.*, **34**, 11 (2018).
3. A. S. Brems-Eskildsen, K. Zieger, H. Toldbod, C. Holcomb, R. Higuchi, F. Mansilla, and L. Dyrskjot, *BMC Cancer*, **10**, 646 (2010).
4. S. F. Shariat, J. A. Karam, Y. Lotan, and P. I. Karakiewicz, *Rev. Urol.*, **10**, 120 (2008).
5. S. Jakhar and C. S. Pundir, *Biosensors. Bioelectro.*, **100**, 242 (2018).
6. S. E. Kim, Y. J. Kim, S. S. Song, K. N. Lee, W. K. Seong, *Sens. Actuator B. Chem.*, **278**, 103 (2019).
7. P. P. Tripathi and R. M. Mehrotra, *Indian J. Chem.*, **43A**, 1887 (2004).
8. M. -Y. Wei, R. Huang, and L. -H. Guo, *J. Electroanal. Chem.*, **664**, 156 (2012).