creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

공학석사 학위논문

터널링 전류를 이용한 MMP-9 암 진단 바이오마커 검출 바이오센서 개발

Electrical Tunneling Biosensor for Detecting MMP-9 Using Concentric Electrode Device

2016 년 2 월

서울대학교 대학원

전기정보 공학부

이 재 웅

터널링 전류를 이용한 MMP-9 암 진단 바이오마커 검출 바이오센서 개발

Electrical Tunneling Biosensor for Detecting MMP-9 Using Concentric Electrode Device

지도 교수 박 영 준

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2016 년 2 월

서울대학교 대학원
전기정보 공학부
이 재 웅

이재웅의 공학석사 학위논문을 인준함
2016 년 2 월

위 원 장 권 성 훈 (인)

부위원장 박 영 준 (인)

위 원 신 동 식 (인)

초 록

암의 중요 바이오마커 (biomarker) 중에 하나인 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)을 전기적으로 측정함으로써, 개인진단이 가능하게 하는 플랫폼 기술을 개발하였다.

MMP-9의 효소역할 통해 분자 체인이 끊어진다고 알려진 펩타이드 (peptide)를 사용하여, peptide와 금 전극 사이의 tunneling 전류의 변화를 측정함으로써 MMP-9을 검출하였다. Tunneling 전류를 증가시키기 위해서 기 사용된 산화환원 리포터 (redox reporter) 역할을 하는 메틸렌 블루 (Methylene blue, MB)를 peptide 말단에 합성한 뒤 동심 구조 전극에 고정화 하여 사용하였다.

바이오 센서를 CMOS회로와 집적시키기 위해서 본 그룹에서 개발된 동심 구조 전극을 사용하였다. 동심구조 전극은 2전극 구조로서 island electrode와 enclosing electrode의 면적이 1000배 이상 차이 나기 때문에 수용액에 대한 전기 이중층 (electrical double layer)의 커패시턴스 (capacitance) 차이로 수용액의 전위가 enclosing electrode의 전압에 고정되는 자기-게이팅 (self-gating) 효과를 가지므로 기준 전극이 없이도 MMP-9에 의한 전류 변화를 검출 가능 할 것이라 예측하였으며,

이를 실험을 통해 확인하였다.

본 연구에서는 전극에 고정화된 MB-peptide가 MMP-9에 의해 잘렸을 때의 전극과 methylene blue 사이의 전자의 이동, 즉 tunneling 전류가 감소함을 확인하였다. 이러한 특성은 MMP-9 이외에 다양한 바이오마커를 검출하는데 유용하게 사용될 수 있는 바이오 센서 플랫폼이 될 것이다.

주요어 : MMP-9, 메틸렌 블루, 펩타이드, 동심 구조 전극, 터널링 전류

학 번 : 2014-21686

목 차

초록 i

목차 iii

표 목차 v

그림 목자 vi

제 1 장 서 론 1

1.1 연구의 배경 1

1.2 연구의 목적 12

1.3 논문의 구성 13

제 2 장 실험 설계 14

2.1 진단 센서 소자 구조 14

2.2 Peptide substrate for MMP-9 20

2.3 Tunneling state로서의 Methylene blue (MB) 21

2.4 MB-peptide 기반 MMP-9 검출 센서 제작 23

2.5 MMP-9 센서의 감응 원리 25

제 3 장 결과 및 분석 27

3.1 MB-peptide 기반 tunneling biosensor의 전류특성 분석 ...27

3.2 전압 인가에 따른 MB-peptide biosensor의 energy state 변화 분석 33

3.3 시간에 따른 전류 변화 측정 37

3.4 MMP-9 농도에 따른 전류 변화 측정 39

제 4 장 결론과 앞으로 연구 제안 41

참고문헌 43

Abstract 47

표 목차

[표 1] 연도별 암 발생자수, 조발생률, 연령표준화발생률 5

[표 2] 2013년 전체 암 검진 수검율 7

그림 목차

[그림 1] Biosensor system..... 3

[그림 2] Electrochemical Biosensor..... 3

[그림 3] SPR 바이오 센서의 검출 원리 5

[그림 4] ELISA의 항원 검출 원리..... 5

[그림 5] LFA 센서의 개념도 6

[그림 6] Structure of the MMP-9 protein 11

[그림 7] 소자 구조. (a) 측면에서 본 소자의 모습, (b) 위에서 본 소자의 모습 14

[그림 8] (a) 동심원 구조 전극 소자의 등가 회로와 수용액의 전위를 결정하는 수식. (b) enclosing electrode와 island electrode 전압 sweep에 대한 수용액의 전위 측정..... 17

[그림 9] 2전극 시스템에서 전극 구조에 따른 전극과 수용액 사이의 전위 profile. (a) Symmetric electrode 구조, (b) Concentric electrode 구조. 19

[그림 10] Peptide substrate for MMP-9. 20

[그림 11] Methylene blue가 합성된 peptide..... 21

[그림 12] Methylene blue - Leucomethylene blue의 산화 환원 mechanism. (a) Methylene blue (MB^+)의 구조식. (b) 환원 단계에서 전자 한 개를 받았을 때의 구조식. (c) 환원 단계에서 전자 한 개와 수소 이온 한 개를 받았을 때의 구조식. (d) Leucomethylene blue (LMB)의 구조식..... 22

[그림 13] (a) 위에서 본 소자의 모습, PDMS well을 만들어 용액을 떨어뜨릴 때 밖으로 넘쳐흐르는 것을 방지한다. (b) 측면에서 본 MB-peptide based MMP-9 biosensor 모습..... 24

[그림 14] (a) 금 전극에 MB-peptide가 고정화 되어있는 상태. (b) 고정화된 MB-peptide와 MMP-9간의 반응 상태. (c) MB-peptide와 MMP-9의 반응 이후의 상태..... 26

[그림 15] MB-peptide biosensor 제작 과정별 전류 변화 그래프 (a) bare electrode에서 측정한 전류 그래프, (b) MB-peptide와 MCH를 고정화 시킨 뒤 측정한 전류 그래프. 28

[그림 16] 다양한 MB-peptide 용액 농도에 따른 peak 전류. 30

[그림 17] Tween 20 washing 유무에 따른 전류 변화 측정 (a) Without tween 20 washing, (b) With tween 20 washing. 32

[그림 18] MB-peptide biosensor의 energy state, (a) 전압이 인가되지 않은 초기 상태, (b) -0.4 V를 5초 동안 인가한 후의 상태. 34

[그림 19] MB-peptide biosensor의 energy state, (a) -0.4 V를 5초 동안 인가한 후의 상태, (b) 0.2V까지 positive voltage sweep을 진행한 후의 상태. 35

[그림 20] Cyclic voltammetry 측정 시, 전압 sweep에 따른 전류 성분 분석. 36

[그림 21] 1nM MMP-9 용액을 떨어뜨린 뒤 측정한 시간에 따른 전류 그래프. 38

[그림 22] 다양한 농도의 MMP-9과 BSA 농도에 따른 전류 변화 그래프 (BSA는 peptide와 특이 반응이 없는 경우로서 control 데이터이다.) 40

제 1 장 서 론

1.1 연구의 배경

1.1.1 암 진단용 바이오센서 (biosensor)의 배경

의료의 패러다임이 '치료'에서 '예방 및 진단'으로 바뀌면서 센서에 바이오 기술을 접목시킨 바이오센서가 큰 주목을 받고 있다. 바이오센서란 "유전자, 암세포, 환경 호르몬 등 특정 물질의 존재 여부를 확인하거나 감지할 수 있는 바이오 소자" 라고 지칭할 수 있다. 즉 특정한 생물학적 물질(bioreceptor)을 이용하여 분석대상 물질(target)과의 반응에서 나타나는 전기화학적 반응, 열에너지, 형광 및 색 변화 등을 사람이 인식 가능한 신호로 변화시켜주는 센서이다. [1, 2]

바이오센서는 일반적으로 검출하고자 하는 분석 물질(target), 검출하고자 하는 target과 선택적으로 반응 및 결합할 수 있는 생체감지물질(bioreceptor), target과 bioreceptor와의 반응을 감지하여 측정할 수 있는 신호로 변환시켜주는 신호변환기(transducer), 그리고 이 신호들을 후처리 해주는 processor 등으로 구성된다 (그림 1).

Bioreceptor는 특정 target의 반응을 통해서 transducer로 측정할 만한 신호를 발생하는 물질을 말한다. 수없이 많고 다양한

화학적, 생물학적 물질들 사이에서 특정 target과의 반응만을 하는 것, 즉 높은 selectivity가 bioreceptor의 가장 중요한 요소이다. 검출하고자 하는 target의 종류가 굉장히 많은 만큼 biosensor에서 사용되는 bioreceptor도 많이 있지만, 보통 1) 항원/항체(antigen/antibody), 2) 효소(enzyme), 3) 핵산(nucleic acids)/DNA, 4) 세포구조/세포(cellular structures/cells) 5) 생체모방 물질(biomimetic materials)의 5가지의 주된 범주로 나눌 수 있다. [3]

Transducer는 광학적, 기계적 전기 화학적인 방법들이 있으며 전기공학에서는 전기화학적인 방법을 가장 많이 사용한다. 전기화학적 바이오센서는 전극을 신호변환기로 사용함으로써 target의 특정 정보를 전기적 신호로 직접 변화시키는 센서를 말한다. 즉, bioreceptor를 전극 표면에 고정 시켜 target과의 생물학적 인식현상을 정량적인 전류 혹은 전위 변화로 변화시키는 장치를 말한다 (그림 2). 대부분의 전기화학적 바이오센서는 그림 2 와 같이 전기적 자극에 대하여 전극과 bioreceptor 사이의 전자의 이동(산화 환원 반응)을 측정한다. 이러한 산화 및 환원 반응을 redox 반응이라 하며, 이 것에 대한 연구는 target의 농도, 평형 상수, 반응 계수뿐만 아니라 전극 표면에서 일어나는 전자의 tunneling 현상, 물질의 흡착 등 여러 가지 현상에 대한 많은 정보를 알려 준다. 전기화학적 바이오센서에서는 일반적으로

전압(v), 전류(i), 전하량(Q), 시간(t) 등의 변수를 측정하여 원하는 물질을 검출하게 된다. 이러한 전기화학적 측정법에는 순환 전압 전류법(cyclic voltammetry), 선형주사전위법(Linear Sweep Voltammetry), 시간대 전류법(chronoamperometry), 시간대 전하법(chronocoulometry), 전기화학 분광분석법(electrochemical Impedance spectroscopy)등 다양한 측정법이 있다. [1, 2]

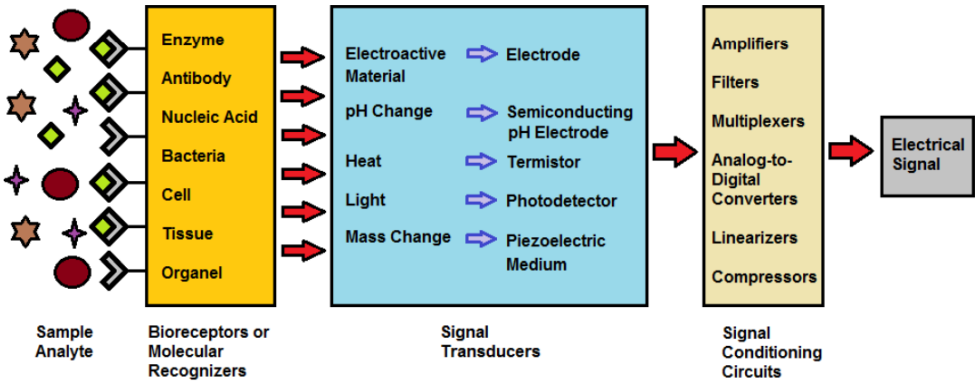


그림 1. Biosensor system.

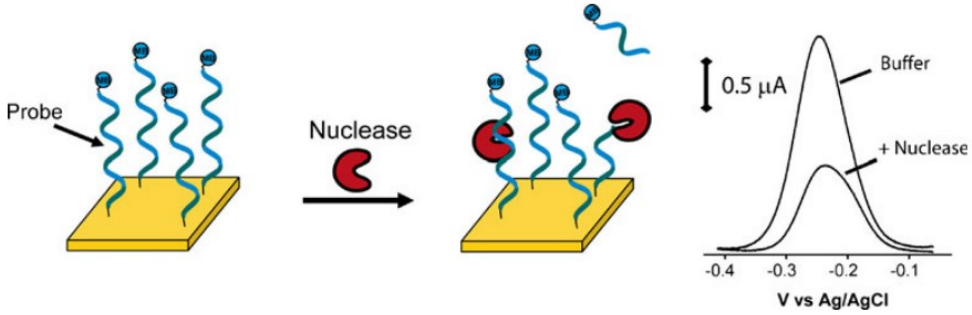


그림 2. Electrochemical Biosensor.

1.1.1.1 다양한 바이오마커 분석 기법 비교

앞 절에서 설명한 전기화학적 바이오센서 외에도 SPR(Surface Plasmon Resonance) 바이오 센서, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), LFA(Lateral Flow Assay, strip sensor) 등의 바이오마커 분석 기법들도 많이 사용되고 있다.

SPR은 금속 표면에 입사한 빛에 의해 들뜬 상태가 된 표면 plasmon의 상태를 가리킨다. SPR 바이오 센서는 금속의 박막 표면에 물질이 결합하였을 때 금속표면의 굴절률이 변하게 되는데, 이때 금속 박막에 빛을 조사하였을 때 반사되는 빛 중 SPR이 일어나는 빛의 공명각(SPR angle)의 변화를 유발하고 이러한 SPR angle의 변화를 통해 단백질과 같은 물질의 결합 정도를 알아 낼 수 있는 센서이다 (그림 3). [4]

ELISA는 방법이 간단하고 비용이 많이 들지 않으며 다량 분석이 가능하여 오늘날 가장 널리 이용되는 면역 측정법으로, 항체 또는 항원에 효소를 표지하고 효소 활성을 지표로 하여 항원항체반응의 강도를 확인하고 이를 통해 항원이나 항체를 정량적으로 측정하는 방법이다 (그림 4). [5]

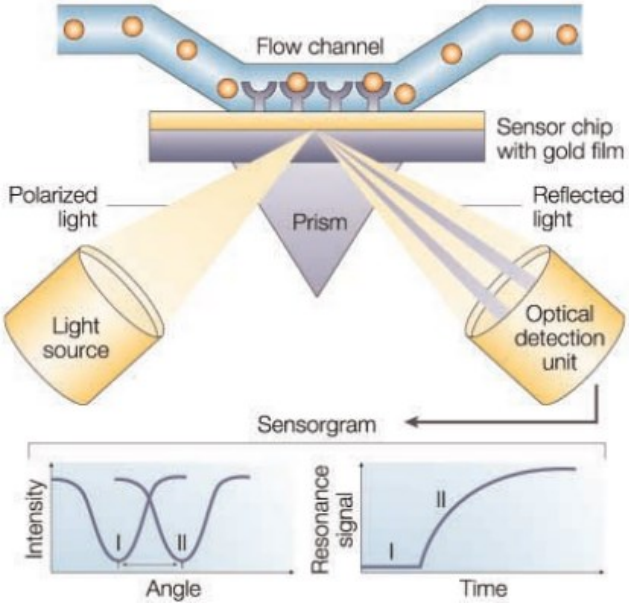


그림 3. SPR 바이오 센서의 검출 원리.

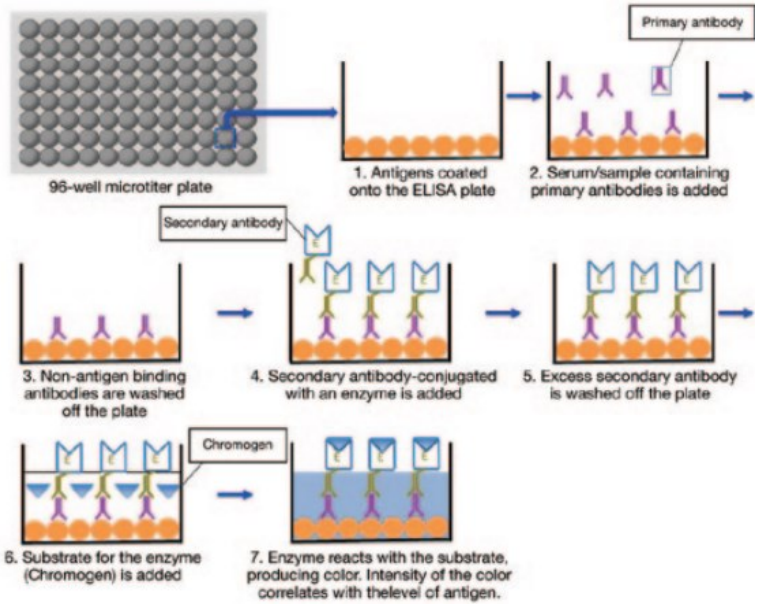


그림 4. ELISA의 항원 검출 원리.

LFA는 ELISA와 같이 항원 항체 반응 측정하는 면역센서의 일종으로, 일반적으로 혈액과 배뇨 분석으로 임신이나 배란, 전염병이나 암 진단까지 다방면으로 사용된다.

LFA 센서는 그림 5 와 같이 측정 대상 물질인 항원에 대해 선택적으로 결합하는 2개의 항체 중 하나를 test line에 고정하고, 다른 하나는 금 나노 입자와 결합한 conjugate를 conjugate pad에 도포하도록 하였다. Control line에는 conjugate에 결합된 항체와 선택적으로 결합하는 2차 항체를 고정하였다. 혈액, 뇨와 같은 시료가 sample pad에 주입되면 membrane 및 패드의 모세관 현상에 의해 absorption pad가 전체적으로 적셔질 때까지 흐름이 형성되며, test line에는 항원의 농도에 비례하여 금 나노 입자 색깔이 진해지게 된다. 이와 같은 LFA 센서는 시료주입 후 보통 10분 이내에 별도의 조작 없이 항원 측정이 가능하므로 POC 진단에서는 매우 유용한 방법이다. [6]

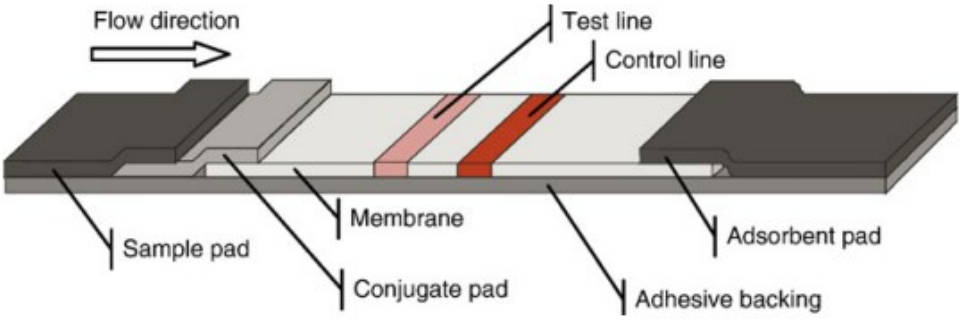


그림 5. LFA 센서의 개념도.

1.1.2 암 (cancer) 개인 진단의 필요성

암이란 세포의 조절 기능에 문제가 생기면서 사멸해야 할 비정상 세포들이 과다 증식하여 주위 조직 및 장기에 침입해 종양을 형성하고 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는 질병을 말한다.

국립암센터 자료에 따르면, 2013년 전체 암 발생률은 인구 10만 명 당 445.7명(남자 449.9명, 여자 441.5명)으로, 2003년 260.2명(남자 287.0명, 여자 233.2명)에 비하여 2배 가까이 증가하였다 (표 1). 가장 빈번히 발생하는 암은 남자의 경우 위암, 대장암, 폐암, 간암, 전립선 암 순이었으며, 여자의 경우는 갑상선 암, 유방암, 대장암, 위암, 폐암 순이었다.

구분	성	1999 년	2003 년	2007 년	2008 년	2009 년	2010 년	2011 년	2012 년	2013 년
발생 자수	남녀전체	101,032	125,707	167,675	182,129	195,842	207,085	221,013	226,216	225,343
	남자	57,594	69,558	88,354	94,682	100,836	105,511	111,590	113,305	113,744
	여자	43,438	56,149	79,321	87,447	95,006	101,574	109,423	112,911	111,599
조 발생률	남녀전체	214.2	260.2	341.3	368.6	394.4	415.2	441.0	449.3	445.7
	남자	243.2	287.0	358.8	382.4	405.3	422.4	444.9	449.8	449.9
	여자	185.0	233.2	323.7	354.8	383.4	407.9	437.2	448.8	441.5
연령 표준화 발생률 *	남녀전체	219.9	238.4	277.8	292.1	304.4	312.3	324.2	322.3	311.6
	남자	291.9	301.7	325.2	333.1	340.3	341.7	348.1	340.0	328.1
	여자	173.3	199.6	254.0	274.1	290.8	304.4	321.2	324.4	313.4

* 우리 나라 2000년 주민등록연앙인구를 표준인구로 사용

표 1. 연도별 암 발생자수, 조 발생률, 연령 표준화발생률.

1983년부터 국가 사망 원인 1위를 차지하고 있는 암은 통계청의 사망원인통계에 따르면 2014년 전체 사망자의 28.6%인 76,611명이 암으로 사망하였으며, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 췌장암 순으로 사망자 수가 많았다. 1999년 이래로 지속적으로 증가하던 암 사망률은 2011년 처음으로 감소추세를 보였는데 이는 암 조기발견 및 치료기술의 혁신적인 발전으로 생존율 역시 증가하였기 때문으로 보인다. [7]

세계보건기구에서는 암 발생의 1/3은 조기 진단 및 조기 치료로 완치가 가능하다고 발표 하였고, 또한 국립암센터에서는 주요 암 조기 발견 시 90% 이상이 5년 생존을 보였다고 발표 할 정도로 암 조기 진단의 중요성이 매우 강조되고 있다. 이에 따라 우리나라에서는 국가 암조기 검진사업을 통하여 암을 조기에 발견하여 치료를 유도함으로써 암으로 인한 사망을 줄이는 것을 목적으로 2001년에 '암 검진 권고안'을 발표하였다.

하지만 암은 상당히 진행될 때까지도 특이 증상이 없을 수 있으며, 암이 진행되어 나타나는 증상들도 평소 흔히 경험 해오던 증상들과 비슷하기 때문에 치료시기를 놓치는 경우가 많고, 많은 사람들이 조기 진단의 중요성을 알고 있음에도 금전적, 시간적인 제약으로 인해 정기적인 건강검진을 받지 않아 2013년 기준 암 검진 수검율이 50%도 되지 않는 상황이다 (표 2). [8]

그렇기 때문에 개인용 암 진단 바이오센서의 중요성과 필요성이 더욱 부각 되고 있다. 집에서 스스로 질병을 진단할 수 있다면, 병원을 예약하여 방문하고, 복잡한 검사를 받는 절차는 현저히 줄어 들 것이고, 진단 센서를 통해 이상을 발견한 경우에만 병원을 방문하면 된다. 또한 바이오센서를 통한 검진은 극소량의 시료만으로도 빠른 시간에 분석이 가능하기 때문에, 길게는 일주일이 걸리는 암 진단의 경우, 특정 바이오마커를 이용하면 짧은 시간 내에 진단이 가능해 정밀진단 필요여부를 결정할 수 있게 된다.

구 분	대상인원(명)	수검인원(명)	수검율(%)	2011년 수검율(%)
계	19,194,911	8,340,858	43.5	39.4
위 암	11,105,864	5,883,648	53.0	52.9
대 장 암	13,121,035	4,028,968	30.7	27.0
간 암	901,287	448,614	49.8	42.0
유 방 암	5,763,025	3,305,804	57.4	58.0
자궁경부암	7,298,134	3,554,493	48.7	46.1

주) 대상인원 및 수검인원의 계는 중복 제거된 수치이므로 항목합계와 다를 수 있음

표 2. 2013년 전체 암 검진 수검율.

1.1.3 암 진단 바이오마커로 Matrix metalloproteinases (MMPs)을 사용하는 이유.

암 세포가 성장하여 침습, 전이를 일으키기 위해서는 암 세포 침습에 일차적인 장벽 역할을 하는 기저막 및 세포외기질의 분해과정이 필수적이기 때문에 암 세포는 다양한 단백질 분해효소를 분비한다.[9] 단백질 분해효소에는 여러 종류가 있는데 특히 matrix metalloproteinases (MMPs)가 암 세포의 침습과 전이 과정 중에 매우 중요한 역할을 하는 분해효소로 알려져 있다. [10, 11]

MMPs는 현재까지 약 23종류(MMP-1, MMP-23)가 발견되었으며, 이들은 각각이 분해하는 기질 특이성에 따라 interstitial collagenase (MMP-1, -8, -13, -18), stromelysins (MMP-3, -10), gelatinases (MMP-2, -9), elastases, membrane type MMPs(MT-MMP) 등으로 구분된다. [12, 13]

1.1.3.1 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)

MMP-9는 MMPs 중 gelatinases에 속하는 분해 효소로서 MMP-2 (gelatinase A, 72 kDa)와 MMP-9 (gelatinase B, 92 kDa)은 기저막의 중요한 성분인 제4형 콜라겐을 분해하고 신생혈관 형성에도 관여하여 암 세포의 침윤성 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.[14] 따라서 MMP-9의 과발현은 유방암과 난소 암 등의 진행과 연관이 있으며, 불량한 생존율에 영향을 미친다고 하였다. [15 – 18]

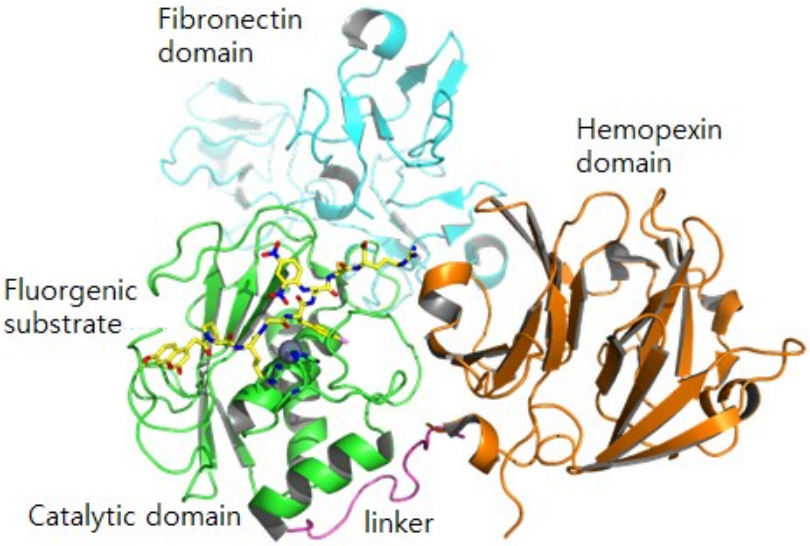


그림 6. Structure of the MMP-9 protein.

1.2 연구의 목적

본 연구에서는 개인 암 진단용 칩 구현에서

- 전기적 진단
- 신호처리를 위한 CMOS device와 집적
- nonspecific target 물질의 영향 감소

을 만족 할 수 있는 바이오센서의 가능성을 탐색하기 위하여

암 진단 바이오마커인 MMP-9을 동심 구조 전극과 MB가 합성된 peptide (MB-peptide)를 이용해 정량적으로 검출할 수 있는 전기적 tunneling current biosensor를 구현하고자 한다. 기존의 전기화학적 biosensor는 전위를 유지시키기 위한 기준 전극을 사용해야 하지만 본 연구에서 사용한 동심 구조 전극의 특징을 이용하여 기준 전극을 사용하지 않고 간단하게 구현 가능하다는 장점을 가지고 있다.

이 목적을 달성하기 위해 동심원 구조 전극에 MB가 합성된 peptide를 고정화 시킨 뒤, 기준 전극 없이 용액의 전위를 잡아주는 동심원 전극의 enclosing electrode는 0V로 고정하고, MMP-9의 반응을 관찰할 island electrode에 전압을 가해주어 MB-peptide와 전극 계면에서 발생하는 전자의 tunneling 현상을 tunneling current를 측정하여 확인한다. 다음으로, 검출하려는 물질인 MMP-9과 전극에 고정시킨 MB-peptide의 반응으로

인한 tunneling current의 변화를 측정하여 MMP-9의 농도를 구하고자 한다.

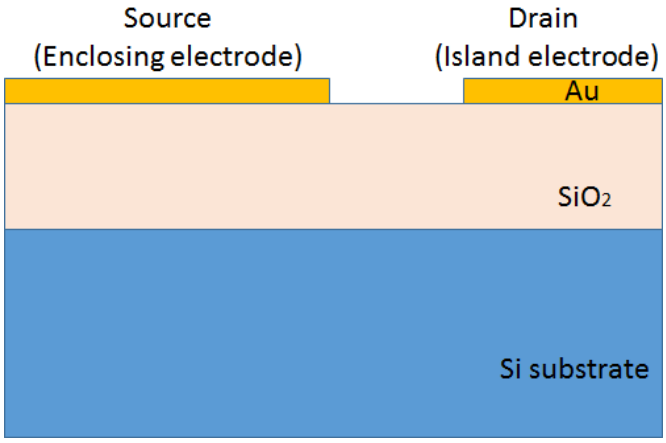
1.3 논문의 구성

본 논문의 구성은 다음과 같다. 2장에서는 소자 구조와 MMP-9을 검출 하기 위해 필요한 중요 요소에 대해서 설명한다. 2.1장은 센서로 사용하는 소자 구조에 대해서, 2.2장은 MMP-9에 특이적으로 반응하는 peptide, 2.3장은 전자의 tunneling state역할을 하는 Methylene blue에 대한 소개, 2.4장에서는 MMP-9 센서 제작 과정, 2.5장에서는 MMP-9 센서의 감응 원리에 대한 내용을 기술 한다. 3장은 바이오 센서 소자를 이용하여 측정한 실험 결과에 대한 내용을 설명하고, 4장에서 결과와 앞으로의 연구 제안으로 논문을 마친다.

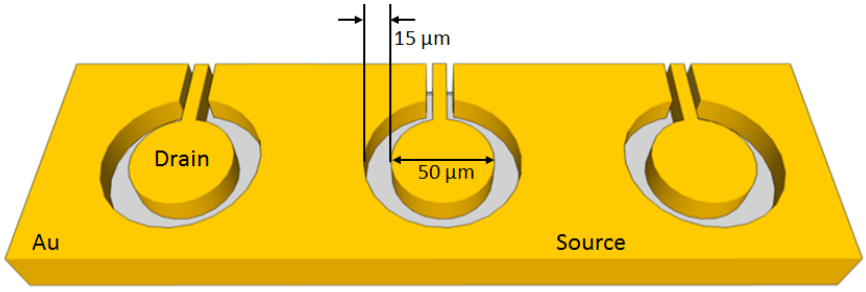
제 2 장 실험 설계

2.1 진단 센서 소자 구조

본 연구에서 사용하게 될 소자는 실리콘 기판 위에 1 um 두께의 실리콘 산화막이 길러져 있고 그 위로 200 nm 두께의 금을 증착하여 전극으로 사용한다. 소자의 단면도는 다음 그림 7(a)와 같다.



(a)



(b)

그림 7. 소자 구조. (a) 측면에서 본 소자의 모습, (b) 위에서 본 소자의 모습.

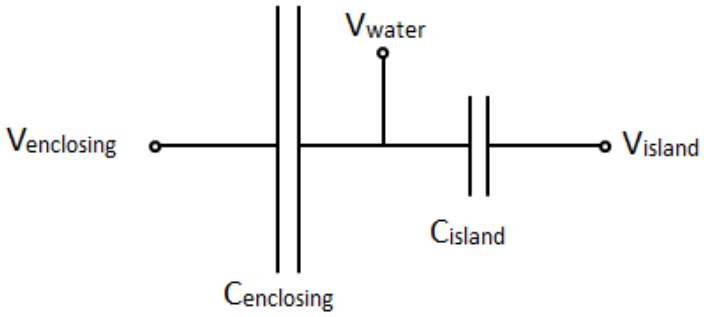
그림 7(b)에서 보듯이 금 전극은 중앙에 있는 섬 전극 (Island electrode)를 외부 전극 (Enclosing electrode)가 둘러싸고 있는 동심 구조로 되어있다. Island electrode의 지름은 50 um이고 enclosing electrode는 island electrode로부터 약 15 um 떨어져있고 island electrode보다 약 1000배 정도 큰 넓이를 가지고 있다.

소자에 떨어뜨리는 수용액의 전위는 수용액과 전극 사이에 생성되는 전기 이중층 capacitance 값에 의해 결정이 되는데, 앞서 설명한 것처럼 enclosing electrode의 크기가 island electrode 보다 매우 크기 때문에 전기 이중층 capacitance 값도 그만큼 커지게 된다. 따라서 간단한 등가 회로와 수식 (그림 8(a))을 통해 확인해 보면 수용액의 전위는 enclosing electrode의 전압에 지배를 받게 된다. [19, 20]

그림 8(b)는 수용액의 전위가 enclosing electrode의 전압에 지배 받는 것을 실험을 통해 확인한 그래프 이다. Island electrode의 전압을 0V로 고정시키고 enclosing electrode의 전압을 −1V ~ 1V까지 sweep 하였을 때 수용액의 전위를 측정하면 그래프의 기울기는 0.907이고, 반대로 enclosing electrode의 전압을 0V로 고정시키고 island electrode의 전압을 sweep 하였을 때 그래프의 기울기는 0.096이다. 그래프에서 볼 수 있듯이 enclosing electrode의 전압을 sweep하였을 때,

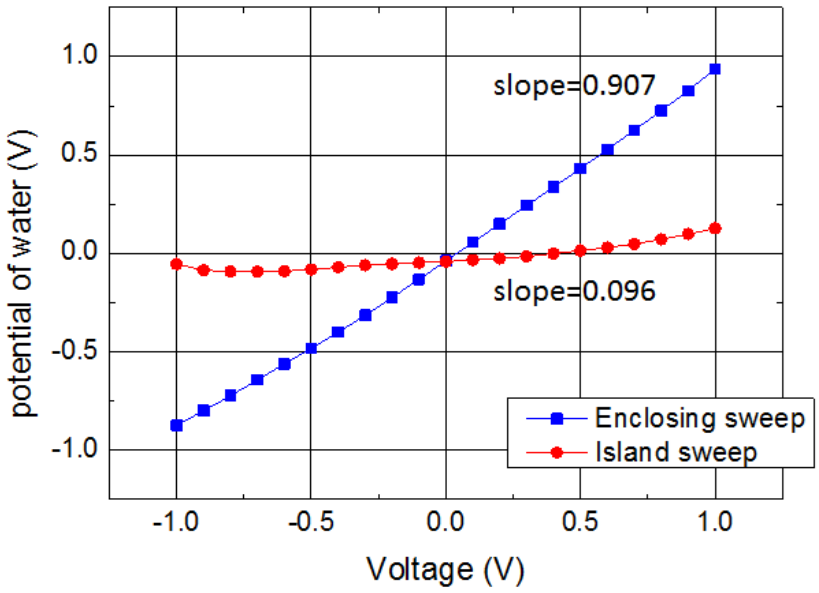
enclosing electrode의 전압 변화에 따라서 수용액의 전위도 변화하기 때문에, 이 기울기는 수용액의 전위가 각 전극의 전압에 지배 받는 비율을 나타낸다.

따라서 이 실험 결과를 통해 우리는 수용액의 전위가 enclosing electrode의 전압에 강하게 지배 받는 것을 확인 할 수 있었고, 이러한 특성을 통해 기준 전극 없이도 검출 실험을 할 수 있었다.



$$V_{water} = \frac{1}{1 + \frac{C_{island}}{C_{enclosing}}} V_{enclosing}$$

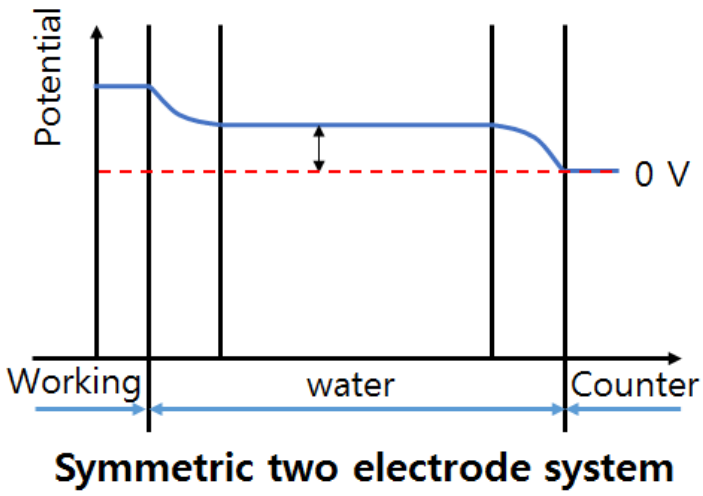
(a)



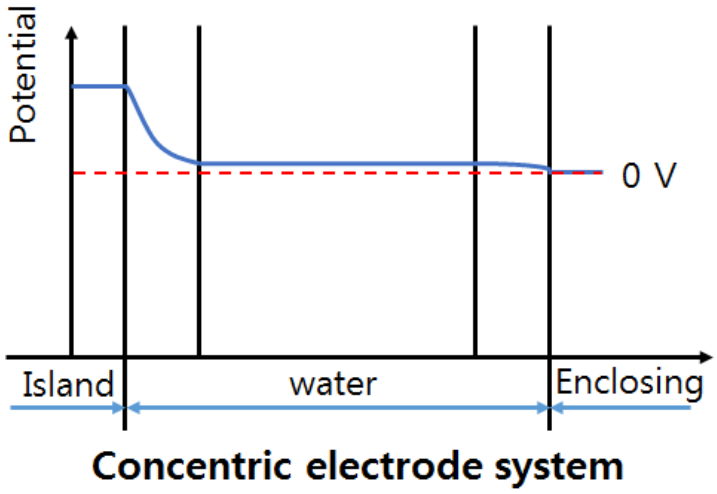
(b)

그림 8. (a) 동심원 구조 전극 소자의 등가 회로와 수용액의 전위를 결정하는 수식, (b) enclosing electrode와 island electrode 전압 sweep에 대한 수용액의 전위 측정.

이러한 현상을 그림 9 에서 간단한 전위 profile로 나타내 보았다. 그림 9(a)는 working electrode와 counter electrode의 면적이 같은 symmetric two electrode system에서의 전위 profile이고 그림 9(b)는 현재 우리가 사용하고 있는 concentric electrode system에서의 전위 profile이다. 그림 9(a)와 같이 working electrode와 counter electrode의 면적이 같은 상태에서 counter electrode를 기준전극으로 사용하게 되면 용액의 전위가 working electrode와 counter electrode에 각각 나뉘어 걸리게 된다.[21, 22] 따라서 결과적으로 우리가 확인 하려는 working electrode와 용액 계면에서의 반응을 정확히 분석하기 어렵기 때문에 대부분의 전기 화학 system에서는 reference electrode를 추가로 사용하여 전위를 잡아주게 된다. 하지만 그림 9(b)와 같이 concentric electrode를 사용하면 용액의 전위가 면적이 큰 전극인 counter electrode 즉 enclosing electrode에 강하게 지배 받기 때문에 island electrode에 걸어준 전압이 온전히 island electrode와 용액 계면에 걸리게 되어서 reference electrode 없이도 정확한 분석을 할 수 있게 된다.



(a)



(b)

그림 9. 2전극 시스템에서 전극 구조에 따른 전극과 수용액 사이의 전위 profile. (a) Symmetric electrode 구조, (b) Concentric electrode 구조.

2.2 Peptide substrate for MMP-9

본 연구는 MMP-9와 특이적으로 반응하는 peptide를 금 전극 (Au electrode)에 고정화 (immobilization)시키고 MMP-9이 peptide 와 반응을 할 때 변하는 tunneling 전류를 측정한다. 본 연구에서 사용한 MMP-9에 특이적으로 반응하는 peptide는 다음과 같다 (그림 10). [23]

● MMP-9 peptide sequence :

Glycine(Gly)-Proline(Pro)-Leucine(Leu)-Glycine(Gly)-Methionine(Met)-Tryptophan(Trp)-Serine(Ser)-Arginin(Arg)-Cysteine (Cys)

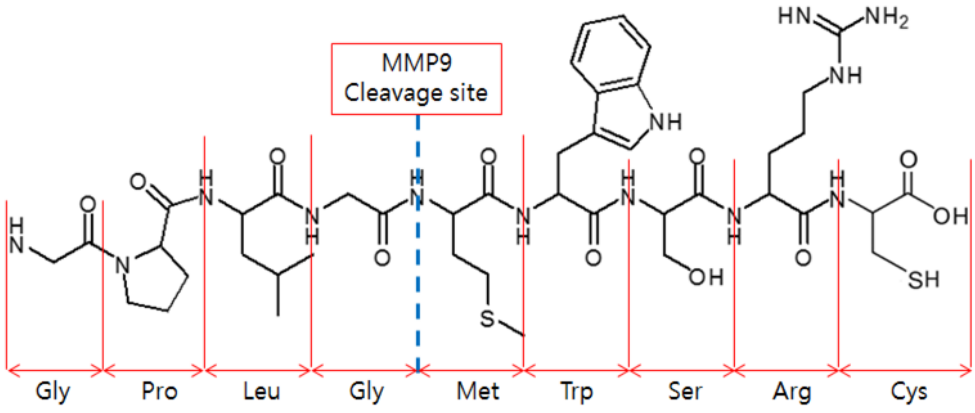


그림 10. Peptide substrate for MMP-9. [23]

2.3 Tunneling state로서의 Methylene blue (MB)

Methylene blue는 헤테로 고리 방향족 화합물로 상온에서는 짙푸른 녹색을 띄며, 산화 시 푸른색, 환원 시 무색을 띄는 특징을 가지고 있기 때문에 주로 산화 환원의 지표로 사용된다.

본 실험에서는 Methylene blue를 그림 10의 peptide의 Gly 부분에 합성하여 전극의 계면에서 전자의 tunneling을 가능하게 해주는 tunneling state로 사용한다 (그림 11).

Methylene blue는 전자 2개와 수소 한 개를 받아 Leucomethylene blue로 환원 되는데, 그림 12과 같이 3 단계의 과정을 거쳐서 환원이 된다. 하지만 2번과 3번 상태는 황 (S)의 최 외각 전자가 각각 9개와 7개인 불안정한 상태이므로 다음 단계로의 반응이 빠르게 일어 난다. [24]

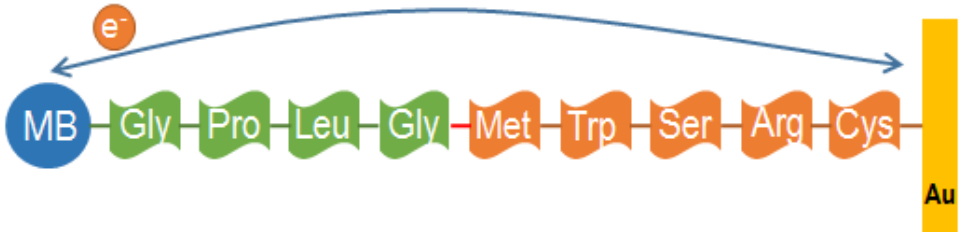


그림 11. Methylene blue가 합성된 peptide.

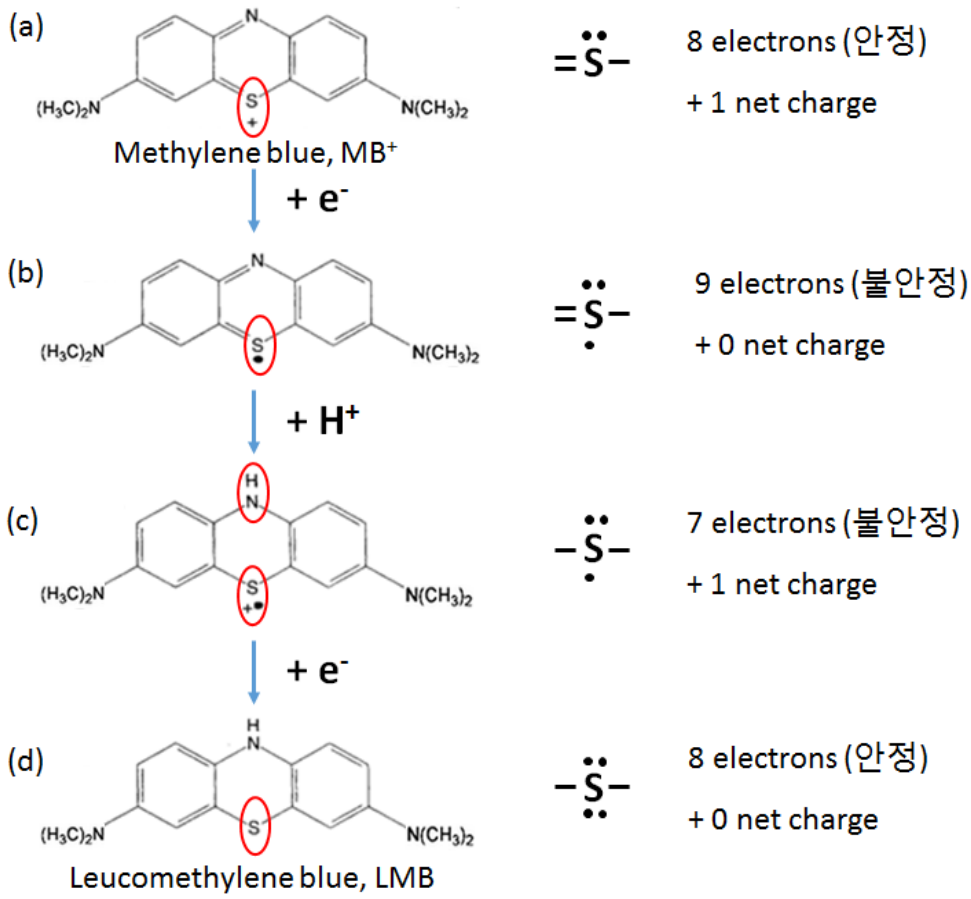
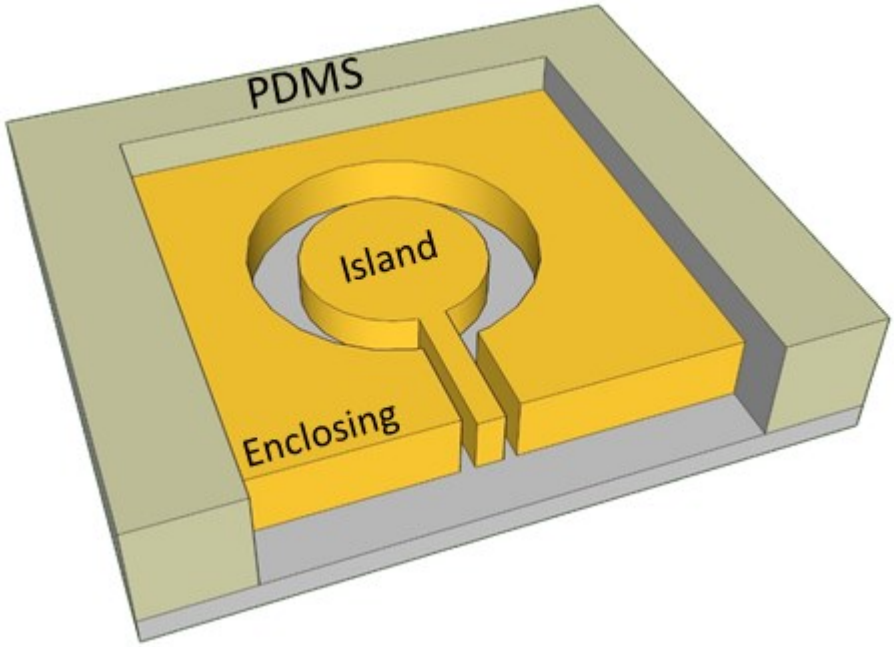


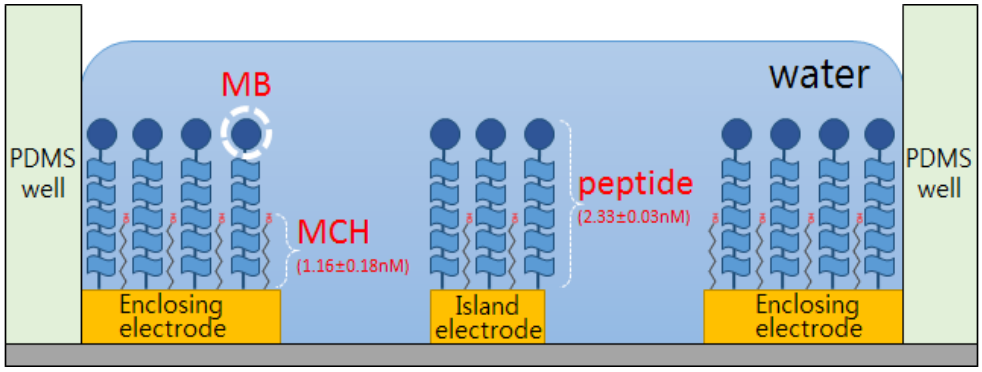
그림 12. Methylene blue – Leucomethylene blue의 산화 환원 mechanism. (a) Methylene blue (MB^+)의 구조식, (b) 환원 단계에서 전자 한 개를 받았을 때의 구조식, (c) 환원 단계에서 전자 한 개와 수소 이온 한 개를 받았을 때의 구조식, (d) Leucomethylene blue (LMB)의 구조식.

2.4 MB-peptide 기반 MMP-9 검출 센서 제작.

이번 장에서는 앞에서 소개한 소자와 peptide를 이용하여 peptide based MMP-9 biosensor를 제작 과정에 대해 말하고자 한다. 2장에서 소개한 동심 전극 구조 소자에서 MMP-9을 검출하기 위해서는 소자의 금 전극 위에 redox reporter인 methylene blue가 합성된 peptide를 고정시켜야 한다. MB-peptide은 동결 건조 된 상태로 Peptron(Daejeon, Korea)이라는 회사를 통해 합성을 의뢰하여 구입하였고, 가루 상태의 MB-peptide에 Dimethyl sulfoxide (DMSO)을 이용해 희석 시켜 MB-peptide 용액을 만들었다. 이 용액을 소자에 incubation 시키기 위해 Polydimethylsiloxane (PDMS)를 이용하여 well을 만들어 MB-peptide 용액을 떨어뜨린 뒤, 2시간동안 반응 시키고 Phosphate buffered saline (PBS) 용액을 이용해 세척하였다. 이 과정에서 MB-peptide는 말단의 cysteine과 금 전극 간의 thiolate 결합을 통해 금 전극에 고정 된다.[25] 다음으로 spacer와 blocking layer 역할을 하는 6-mercapto-1-hexanol (MCH)을 떨어뜨리고 1시간 동안 반응 시켜 최종적으로 peptide based MMP-9 biosensor를 제작 하였다 (그림 13).



(a)



(b)

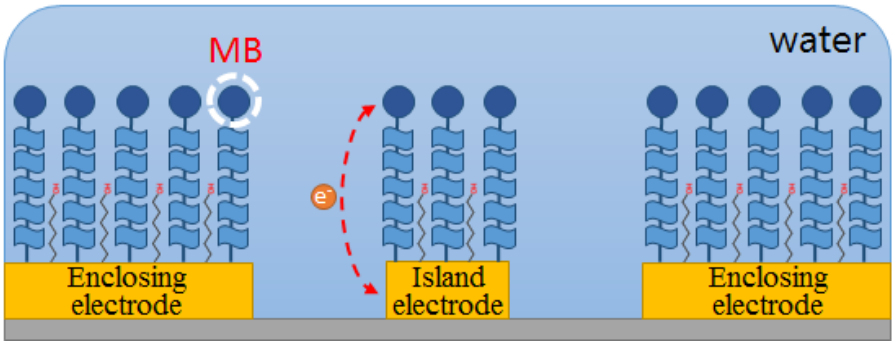
그림 13. (a) 위에서 본 소자의 모습, PDMS well을 만들어 용액을 떨어뜨릴 때 밖으로 넘쳐흐르는 것을 방지 한다, (b) 측면에서 본 peptide based MMP-9 biosensor 모습.

2.5 MMP-9 센서의 감응원리

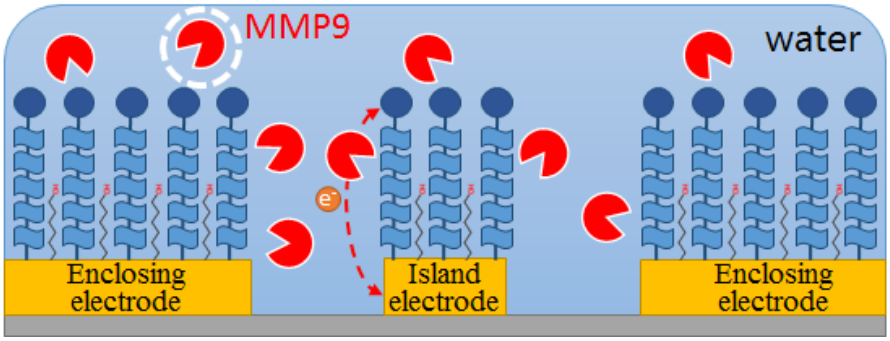
본 센서는 금 전극 위에 MMP-9과 특이적으로 반응하는 peptide를 고정화시키고, peptide에 합성되어있는 전기화학적 활성물질인 methylene blue에 의한 전자 tunneling 현상을 측정하여 MMP-9의 농도를 정량적으로 측정하는 원리에 기반하고 있다.

Methylene blue가 합성된 peptide를 금 전극에 고정 시킨 뒤, island electrode에 전압을 인가해 주면 전극과 methylene blue 사이에서 전자의 tunneling 현상이 일어나 전류가 측정된다. Methylene blue가 전자의 tunneling state 역할을 하기 때문에 금 전극에 고정되어 있는데 methylene blue의 개수에 따라서 tunneling 전류가 변하게 된다.

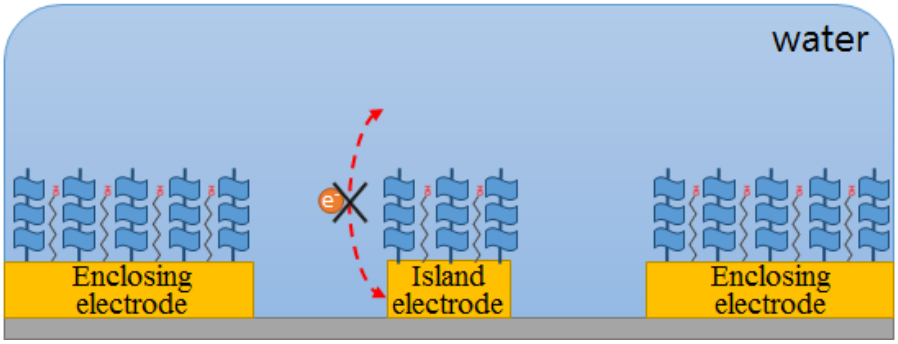
이러한 MB-peptide가 고정되어있는 금 전극에 MMP-9을 넣어주게 되면 peptide의 일부분이 잘려나가게 되고 peptide에 합성되어있는 methylene blue 또한 잘려진 peptide와 함께 금 전극에서 떨어져 나가게 된다. 따라서 전자가 tunneling 할 수 있는 tunneling state인 methylene blue의 개수가 줄어들게 되어 tunneling 전류가 감소하게 되고, 이 전류 감소를 측정하여 MMP-9의 농도를 정량적으로 검출 할 수 있다 (그림 14).



(a)



(b)



(c)

그림 14. (a) 금 전극에 MB-peptide가 고정화 되어있는 상태,
(b) 고정화된 MB-peptide와 MMP-9간의 반응 상태,
(c) MB-peptide와 MMP-9의 반응 이후의 상태.

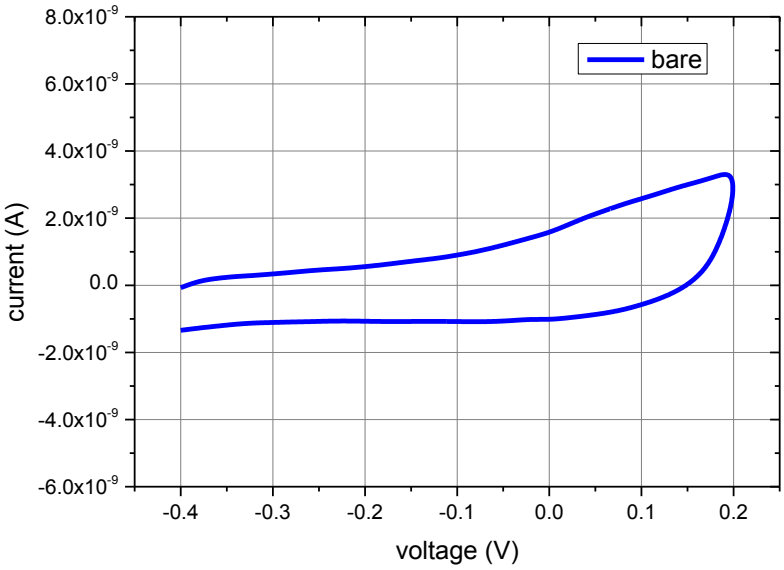
제 3 장 결과 및 분석

3.1 MB-peptide 기반 tunneling biosensor의 전류 특성 분석

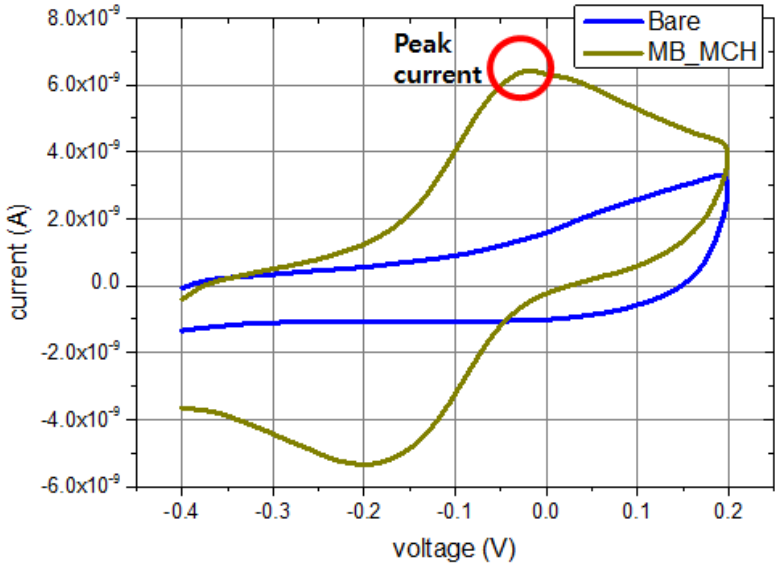
3.1.1 Biosensor 제작 과정에 따른 전류 파형 변화 측정

앞 장에서 설명한 MMP-9의 센서 제작 과정마다 전류를 측정하여 각 단계별 전류의 변화를 통해 peptide의 고정화가 제대로 이루어 졌는지 확인해 보았다. 먼저, concentric electrode device에서 bare electrode 상태, 즉 금 전극 위에 아무것도 고정화 시키지 않은 상태에서 PBS 용액만 떨어뜨려 전류를 확인하였다 (그림 15(a)). Bare electrode 상태에서는 전자의 tunneling이 발생할 수 있는 tunneling state가 존재하지 않기 때문에, 전압 전류 그래프에서 tunneling이 발생할 때 나타나는 peak 전류가 나타나지 않았다.

다음으로 전자의 tunneling state 역할을 하는 MB-peptide를 2시간 동안 고정화 시키고, MB-peptide가 고정화 되지 않은 금 전극 표면을 blocking하고 spacer역할을 하는 MCH까지 1시간 고정화 시킨 뒤 전류를 측정하면 다음 그림과 같이 전류가 변하게 된다 (그림 15(b)).



(a)



(b)

그림 15. MB-peptide biosensor 제작 과정별 전류 변화 그래프
(a) bare electrode에서 측정한 전류 그래프,
(b) MB-peptide와 MCH를 고정화 시킨 뒤 측정한 전류 그래프.

3.1.2 MB-peptide 농도 최적화

금 전극에 고정화 시키는 MB-peptide의 농도를 최적화 하기 위한 실험을 진행하였다. 금 전극에 다양한 농도 (0.1uM - 100uM)의 MB-peptide 용액을 떨어 뜨려 금 전극에 고정화 시킨 뒤, cyclic voltammetry를 통해 그림 15(b)의 녹색과 같은 전류를 측정하였다. 측정한 전류를 통해 MB-peptide의 각 농도별 peak 전류를 비교해 보았다 (그림 16).

0.1uM와 1uM 농도에서는 전극에 고정화되는 MB-peptide의 양이 적어서 이후 MMP-9 반응 실험을 할 만큼의 충분한 전류가 흐르지 않았다. 5uM 이상부터는 MMP-9 반응 실험을 진행할 만한 충분한 전류가 흐르는 것을 확인 하였다. 10uM와 100uM까지 MB-peptide의 농도에 따라 전류도 증가하였지만 증가 폭이 매우 적고, MB-peptide의 가격이 고가이기 때문에 진단용 바이오센서로서 경제적인 측면을 고려하여 5uM의 농도로 실험을 진행 하였다.

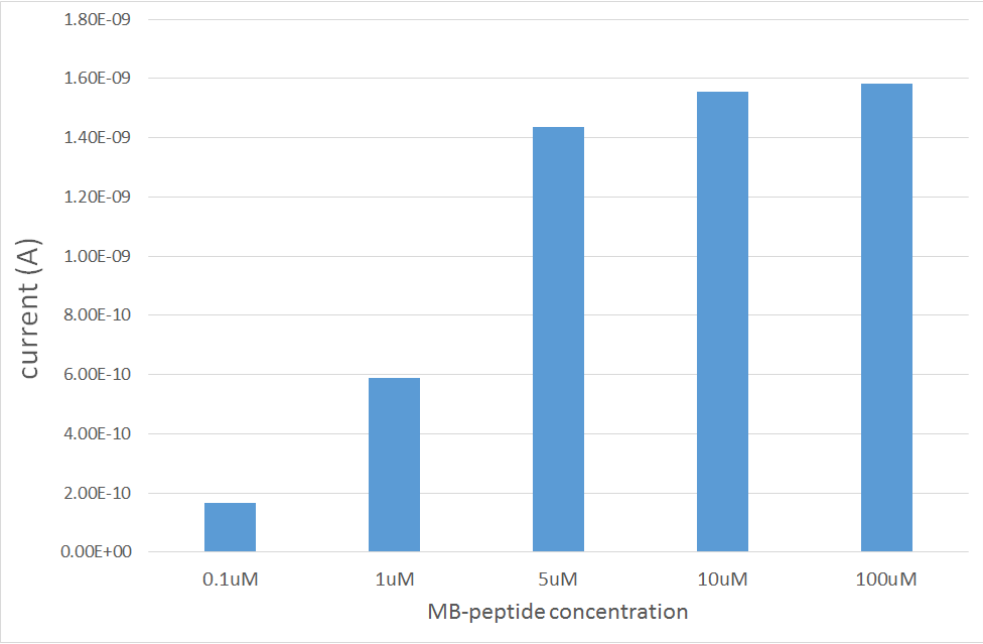


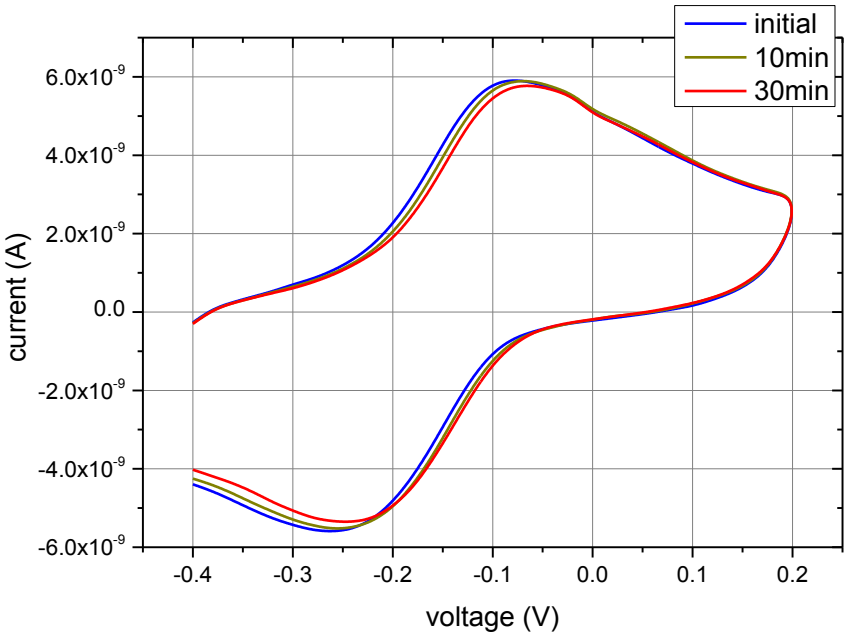
그림 16. 다양한 MB-peptide 용액 농도에 따른 peak 전류

3.1.3 물리 흡착 된 물질을 제거 하기 위한 Tween 20 washing 의 영향

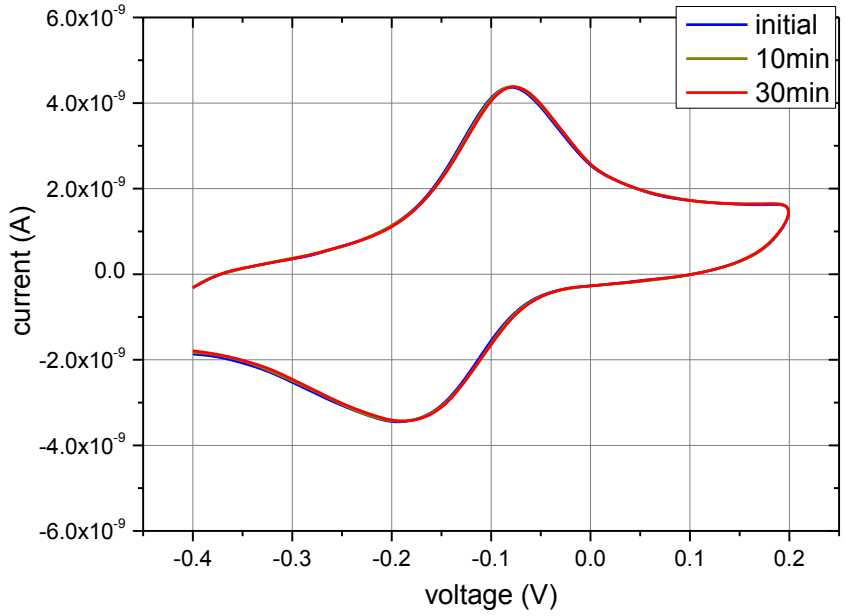
금 전극에 MB-peptide와 MCH를 고정 시키면, 그림 15(b)와 같이 MB와 전극 사이의 tunneling 전류가 측정되는 것을 확인하였다. 하지만 MB-peptide와 MCH까지 고정화 시킨 뒤, 바로 PBS 용액을 떨어뜨리고 전류를 측정하면 전류가 시간에 따라서 계속 감소하는 것을 확인 하였다 (그림 17(a)). 이는 전극과 thiol 반응을 통해 고정화 되지 않고, 단순히 전극에 물리적으로 흡착되어있던 MB-peptide와 MCH가 PBS 용액 상태에서 시간이 지남에 따라 떨어져 나가면서 발생하는 현상으로 볼 수 있다. 이렇게 MMP-9이 전혀 들어있지 않은 PBS 용액에서도 전류가 감소되는 현상이 지속되면 MMP-9에 따른 전류 변화를 검출하는 것이 불가능 하기 때문에, tween 20을 이용한 washing 단계를 추가하여 전극에 흡착된 물질들을 제거해 주었다. [26], [27]

Washing 방법은 다음과 같다. MB-peptide와 MCH가 고정화된 전극에 tween 20을 떨어뜨리고 30분 동안 incubation 시킨 뒤, 흐르는 DI water로 wash하고 N2 gun을 이용해 말려 주었다.

이렇게 tween 20 wash를 진행한 뒤 시간에 따른 전류를 측정하면, 그림 17(a)에서 발생하였던 전류 감소 현상이 더 이상 일어나지 않는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 17(b)).



(a)



(b)

그림 17. Tween 20 washing 유무에 따른 전류 변화 측정

(a) Without tween 20 washing, (b) With tween 20 washing.

3.2 전압 인가에 따른 MB-peptide biosensor의 energy state 변화 분석

Bare electrode에서 측정한 전류와 비교하여 금 전극에 MB-peptide를 고정화시킨 후 측정한 전류의 변화에 대해서 energy state를 통해 분석을 해보았다. [28]

본 연구에서는 cyclic voltammetry를 이용해 전류를 측정하였다. 전압은 초기에 −0.4V로 5초 동안 인가해준 뒤 0.2V까지 double sweep을 하였고, scan rate는 10 V/sec로 측정을 진행하였다.

먼저 전압을 인가하기 전의 MB−peptide biosensor의 energy state는 그림 18(a)와 같다. 전압을 인가하지 않은 평형 상태일 때는 MB−peptide가 MB+와 LMB 두 가지 상태로 공존해 있다. 이때 −0.4V의 전압을 계속 인가해주면 그림 18(b)와 같이 금 전극의 energy level이 높아지게 되어 금 전극에서 MB+로 전자의 tunneling이 발생하게 되고 결과적으로 biosensor 계면의 상태는 모두 LMB로 바뀌게 된다. 이와 같이 초기 계면의 상태를 MB+와 LMB가 공존하는 상태에서 LMB상태로 바꾼 뒤에 전류 측정을 진행하게 된다.

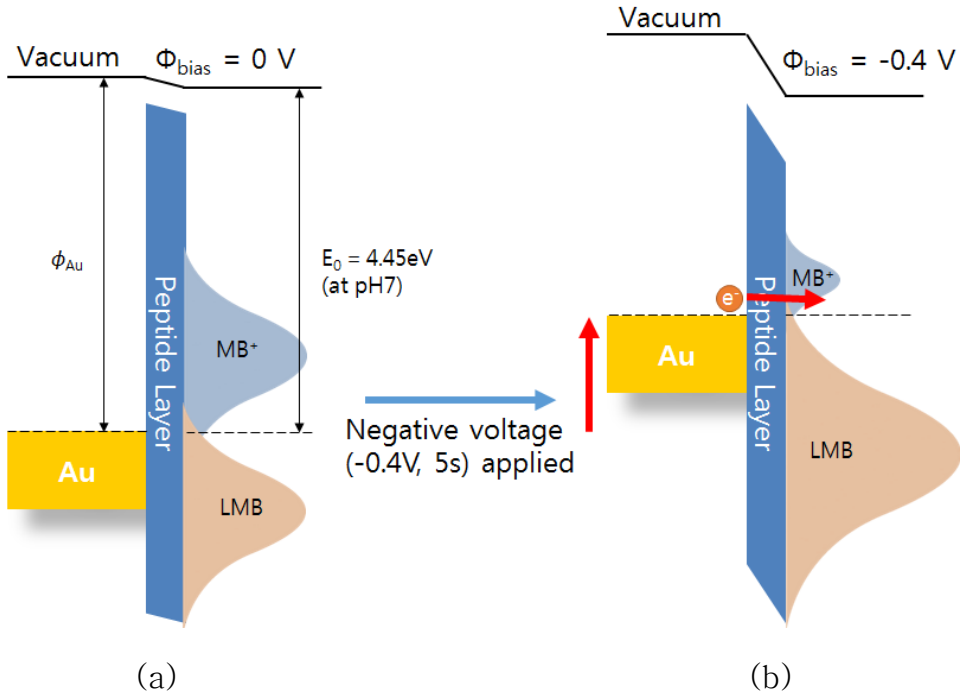


그림 18. MB-peptide biosensor의 energy state. [28] (a) 전압이 인가되지 않은 초기 상태, (b) -0.4 V를 5초 동안 인가한 후의 상태.

다음으로 0.2V까지 전압을 sweep 하면서 전류를 측정하면 그림 19(b)와 같이 금 전극의 energy level이 낮아 지기 때문에 LMB에서 전극으로 전자의 tunneling이 일어난다. 0.2V까지 sweep을 한 이후에는 다시 -0.4V까지 전압을 sweep하는데 이때는 positive voltage sweep을 했을 때와 반대로 전극에서 MB+로의 전자의 tunneling이 일어나게 된다.

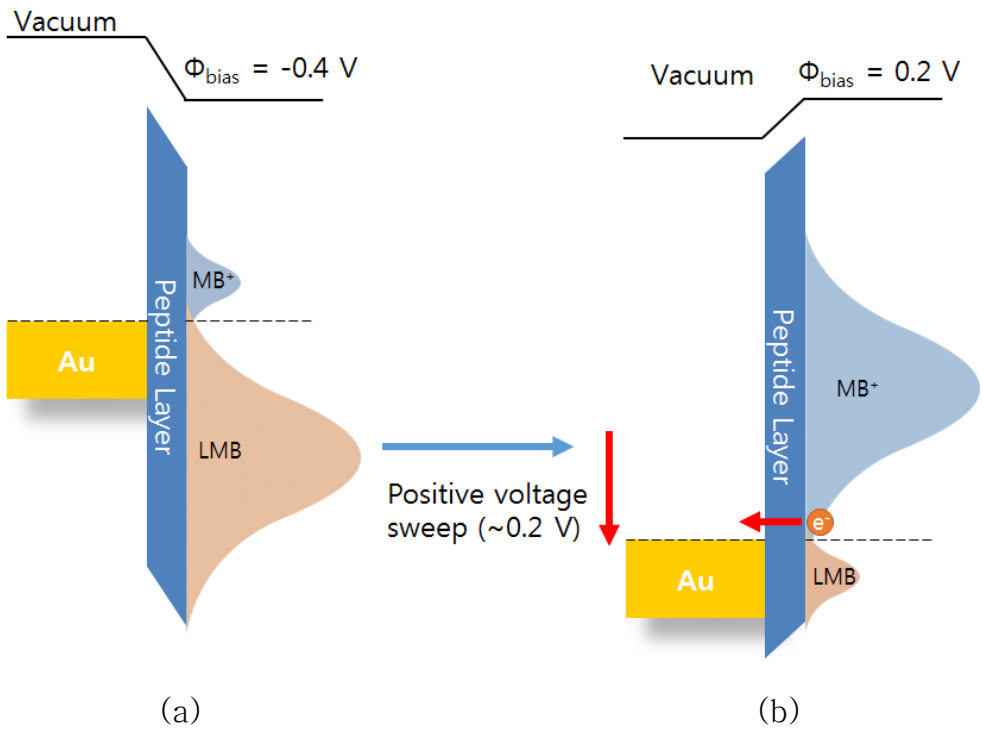


그림 19. MB-peptide biosensor의 energy state. (a) -0.4 V를 5초 동안 인가한 후의 상태, (b) 0.2V까지 positive voltage sweep을 진행한 후의 상태.

앞에서 설명한 voltage sweep의 모든 과정을 전류 그래프로 나타내면 그림 20 과 같다. 초기에 -0.4V를 5초동안 인가하여 계면의 상태를 모두 LMB로 바꾼 뒤, 0.2V까지 positive voltage sweep을 하게 되면 LMB에서 전극으로 전자의 tunneling이 일어나면서 전류가 계속 증가하게 된다. 하지만 계면에 전자를 내어줄 수 있는 LMB가 모두 고갈되면 전류가 감소하게 된다. 0.2V까지

sweep이 끝난 후 반대로 −0.4V까지 negative voltage sweep을 하게 되면 전극에서 MB+로 전자의 tunneling이 일어나면서 전류가 증가하고 마찬가지로 전자를 받을 수 있는 MB+가 고갈되면 전류가 감소하면서 그림 20과 같은 전류 파형이 나타나게 된다.

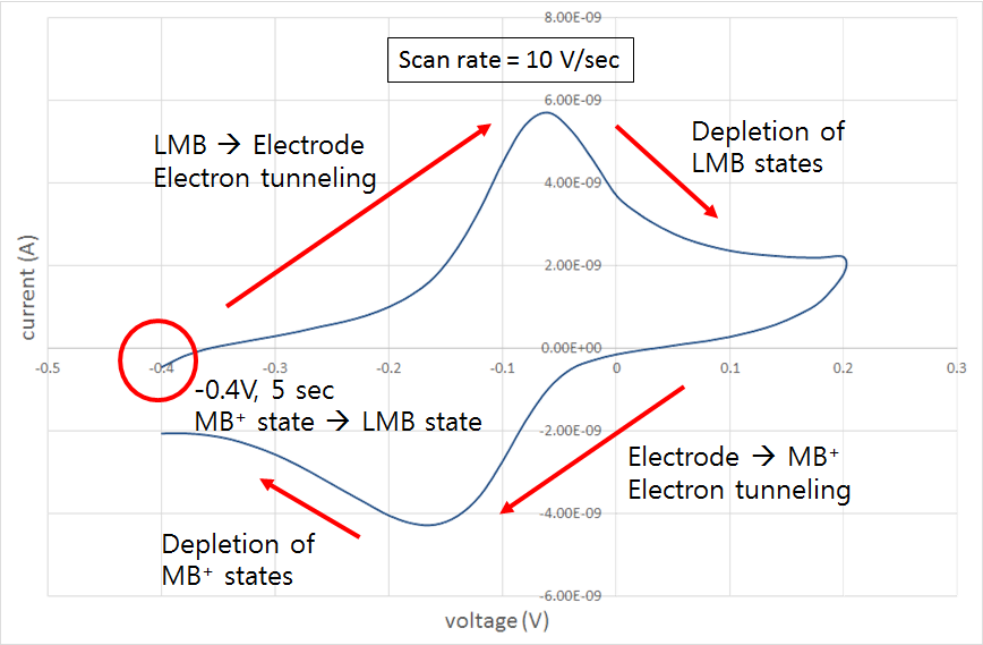


그림 20. Cyclic voltammetry 측정 시, 전압 sweep에 따른 전류 성분 분석.

3.3 시간에 따른 전류 변화 측정

앞 절에서 언급한 방법에 따라 제작된 biosensor를 이용해 MMP-9을 검출하는 실험을 진행 하였다. PBS 용액 상태에서 전류의 감소 현상이 일어나지 않는 것을 확인한 뒤 MMP-9을 떨어뜨려 시간 별로 전류를 측정하였다 (그림 21). 그림에서 볼 수 있듯이 MMP-9을 떨어뜨리면 시간에 따라 전류가 점차적으로 감소하게 된다. 이는 앞서 말한 것처럼 MMP-9에 의해 MB-peptide가 잘려나가게 되면서 전자의 tunneling site 역할을 하는 MB가 peptide와 함께 떨어져 나가기 때문에 일어나는 현상이다.

MMP-9을 떨어뜨린 다음 10분 후부터 60분까지 10분 단위로 전류를 측정한 뒤 용액 내에 존재하는 잘려나간 MB-peptide을 제거하기 위해 PBS 용액을 이용하여 wash를 진행하고 최종 전류를 측정하였다.

그림 21은 1nM의 MMP-9 용액을 떨어뜨린 뒤 시간에 따른 전류 변화를 측정한 그래프 이다. 60분 동안 반응을 시키고 wash까지 진행을 하면 PBS 용액 전류 대비 22.12%의 전류가 감소된 것을 확인 할 수 있었다.

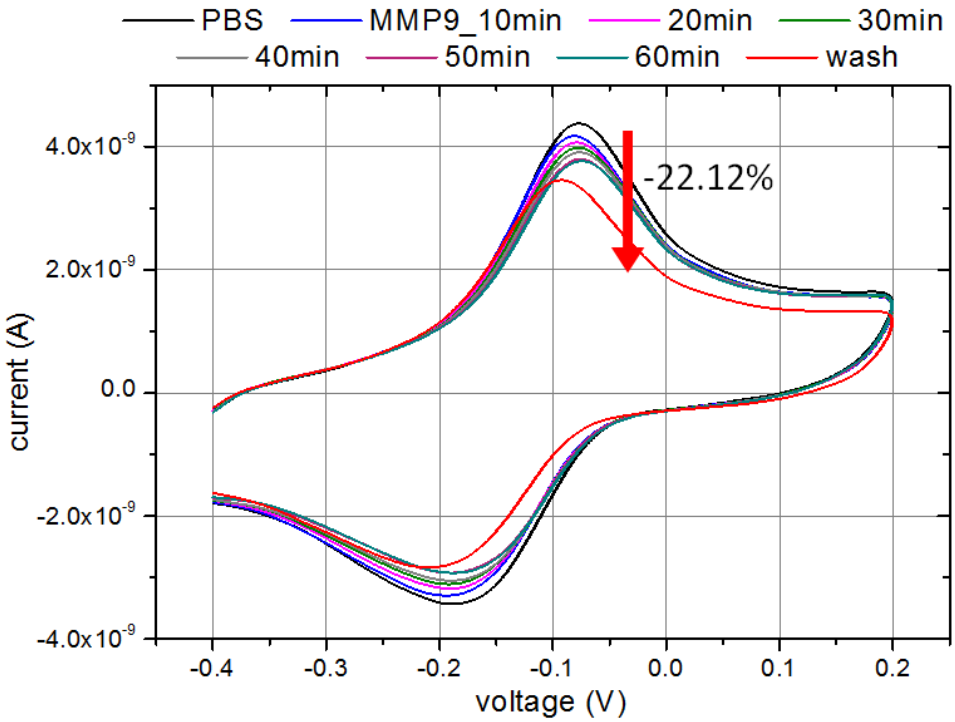


그림 21. 1nM MMP-9 용액을 떨어뜨린 뒤 측정한 시간에 따른 전류 그래프.

3.4 MMP-9 농도에 따른 전류 변화 측정

다양한 농도의 MMP-9과 추가로 MB-peptide와 반응하지 않는 물질 (non-specific target)인 BSA를 이용하여 농도 별 전류 감소율을 측정하였다. 실험은 앞 절에서 언급한 것과 같이 PBS 용액 대비 target을 떨어뜨리고 60분 후 washing 과정까지 거친 후 감소한 전류를 측정하였다.

MMP-9은 0.1pM 부터 10nM까지 10배 단위로 총 6개의 농도를 사용하였고, BSA는 1nM부터 100nM까지 3가지의 농도를 사용하여 실험을 진행하였다 (그림 23). 그림에서 볼 수 있듯이 1pM부터 1nM까지는 농도에 따른 경향성이 뚜렷하게 나타나는 것을 볼 수 있다. 하지만 0.1pM 실험에서는 1pM과 비교 하여 전류 변화의 차이가 거의 없는 것을 확인 하였다. 또한 10nM에서도 1nM 대비 더 큰 전류 감소가 일어나지 않았기 때문에 MB-peptide biosensor를 통해 측정 가능한 농도 범위는 1pM – 1nM인 것을 확인 하였고, 1pM의 오차 범위를 통해 계산한 검출 한계는 약 5-6pM 정도가 되는 것을 확인 할 수 있었다.

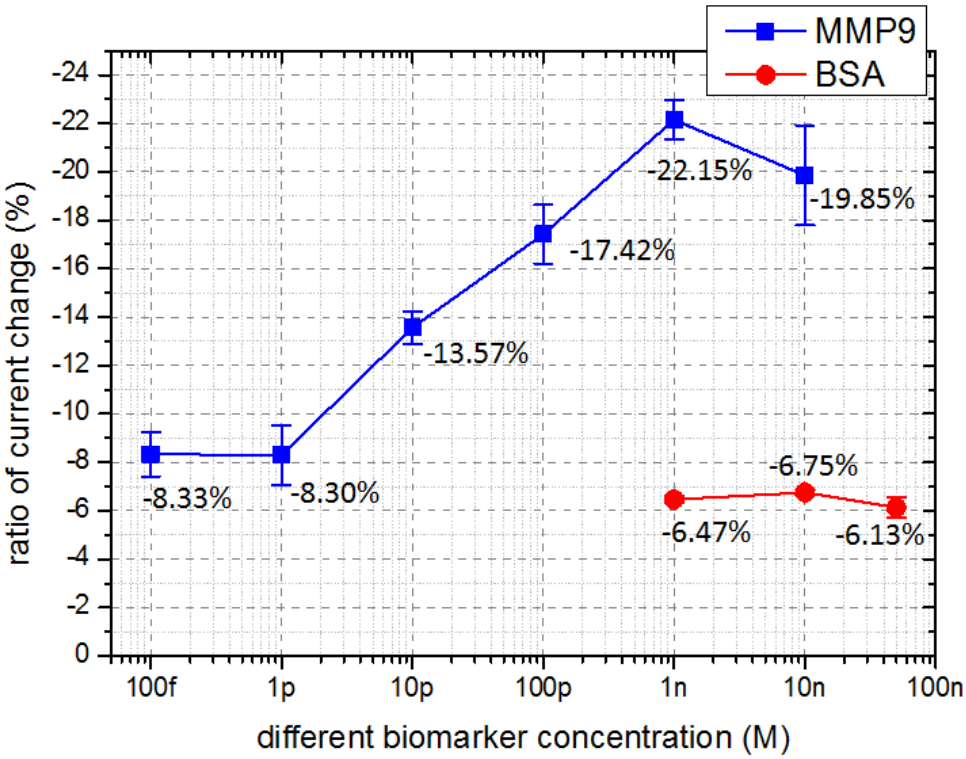


그림 22. 다양한 농도의 MMP-9과 BSA 농도에 따른 전류 변화 그래프. (BSA는 peptide와 특이 반응이 없는 경우로서 control 데이터이다.)

제 4 장 결론과 앞으로 연구 제안

본 연구에서는 암의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 MMP-9을 검출하는 전기적 tunneling biosensor를 개발하였다. Enclosing electrode의 면적이 island electrode의 면적보다 1000배 이상 큰, concentric electrode의 구조적 특징을 통해 기준 전극이 없이 두 전극 만을 사용하여 biosensor를 더욱 간단하고 소형화 할 수 있었다.

MMP-9을 검출하기 위하여 특이적으로 반응하는 MB-peptide를 금 전극에 고정화하였고, 추가적으로 MCH 고정화와 tween 20 wash를 통해 안정적인 전압 전류 그래프를 얻을 수 있었다. 이렇게 제작된 바이오센서는 검출한계가 약 5~6pM 정도로 MMP-9을 검출 할 수 있었고, 다른 물질을 대조 군으로 사용하였을 때 농도에 따른 경향성이 보이지 않는 것까지 확인 하였다.

본 연구를 통해 MB-peptide와 concentric electrode 구조를 이용한 바이오 센서를 통해 peptide와 특이 반응을 하는 물질을 검출할 수 있음을 확인하였으며, 또한 이러한 센서의 특징을 이용하여 MMP-9 뿐만 아니라 다양한 물질을 검출하는 바이오센서로 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구의 목적인 개인 암 진단용 전기 바이오 센서의 응용을 위해서 더 필요한 연구 항목을 제안하면 다음과 같다.

- serum 실험을 바탕으로 한 실제 혈액 sample에서의 바이오마커 검출
- 다양한 nonspecific target을 이용한 센서의 selectivity 검증
- CMOS 칩의 여러 cell을 활용하여 다양한 바이오마커의 동시 진단

참고 문헌

[1] J. Wang, “Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 10, pp. 1887–1892, 2006.

[2] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, “Electrochemical biosensors,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 5, p. 1747, 2010.

[3] T. Vo-Dinh and B. Cullum, “Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics.,” *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 366, no. 6–7, pp. 540–551, 2008.

[4] M. A. Cooper, “Optical biosensors in drug discovery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 7, pp. 515–528, 2002.

[5] S. D. Gan and K. R. Patel, “Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 9, p. e12, 2013.

[6] S. Assadollahi, C. Reininger, R. Palkovits, P. Pointl, and T. Schalkhammer, “From lateral flow devices to a novel nano-color microfluidic assay,” *Sensors*, vol. 9, no. 8, pp. 6084–6100, 2009.

[7] 통계청, “사망원인통계,” 통계청, 2015.

[8] 통계청, “2013 건강검진통계연보,” 통계청, 2014.

[9] C. T. Cotran RS, Kumar V, *Pathologic basis of disease*, 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999.

[10] R. Visse and H. Nagase, “Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.,” *Circ. Res.*, vol. 92, no. 8, pp. 827–39, 2003.

[11] T. E. Curry and K. G. Osteen, “Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus.,” *Biol. Reprod.*, vol. 64, pp. 1285–1296, 2001.

[12] W. G. Stetler-Stevenson, “Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 148, no. 5, pp. 1345–50, 1996.

[13] J. L. Jones and R. A. Walker, “Control of Matrix Metalloproteinase Activity in Cancer,” *J. Pathol.*, vol. 183, no. June, pp. 377–379, 1997.

[14] K. J. Heppner, L. M. Matrisian, R. a Jensen, and W. H. Rodgers, “Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 149, no. 1, pp. 273–282, 1996.

[15] B. Davidson, I. Goldberg, W. H. Gotlieb, J. Kopolovic, G. Ben-Baruch, J. M. Nesland, a Berner, M. Bryne, and R. Reich, “High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma.,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 17, no. 10, pp. 799–808, 1999.

[16] H. Yokota, T. Kumata, S. Taketaba, T. Kobayashi, H. Moue, H. Taniyama, K. Hirayama, Y. Kagawa, N. Itoh, O. Fujita, T. Nakade, and A. Yuasa, “High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1568, no. 1, pp. 7–12, 2001.

[17] M. Nakajima, D. R. Welch, D. M. Wynn, T. Tsuruo, and G. L. Nicolson, "Serum and plasma Mr 92,000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma," *Cancer Res.*, vol. 53, pp. 5802–5807, 1993.

[18] M. M. Pacheco, M. Mourao, E. B. Mantovani, I. N. Nishimoto, and M. Mitzi Brentani, "Expression of gelatinases A and B, stromelysin−3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinico−pathological correlations.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 16, no. 7, pp. 577–85, 1998.

[19] D. W. Kim, G. S. Choe, S. M. Seo, J. H. Cheon, H. Kim, J. W. Ko, I. Y. Chung, and Y. J. Park, "Self−gating effects in carbon nanotube network based liquid gate field effect transistors," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 93, no. 24, pp. 1–4, 2008.

[20] J. H. Cheon, J. Lim, S. M. Seo, J. M. Woo, S. H. Kim, Y. Kwon, J. W. Ko, T. J. Kang, Y. H. Kim, and Y. J. Park, "Electrical characteristics of the concentric−shape carbon nanotube network device in pH buffer solution," *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 57, no. 10, pp. 2684–2689, 2010.

[21] M. Gouy, "Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte," *J. Phys. Théorique Appliquée*, vol. 9, no. 1, pp. 457–468, 1910.

[22] D. L. Chapman, "A contribution to the theory of electrocapillarity," *Philos. Mag.*, vol. 25, pp. 475–481, 1913.

[23] S. Netzel−Arnett, S. K. Mallya, H. Nagase, H. Birkedal−Hansen, and H. E. Van Wart, "Continuously recording fluorescent assays optimized for five human matrix metalloproteinases.," *Anal. Biochem.*, vol. 195, no. 1, pp. 86–92, 1991.

[24] G. I. Pennarun, C. Boxall, and D. O'Hare, "Micro−optical Ring Electrode: Development of a Novel Electrode for Photoelectrochemistry," *Analyst*, vol. 121, no. December, pp. 1779–1788, 1996.

[25] D. S. Shin, Y. Liu, Y. Gao, T. Kwa, Z. Matharu, and A. Revzin, "Micropatterned surfaces functionalized with electroactive peptides for detecting protease release from cells," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 1, pp. 220–227, 2013.

[26] K. Kerman, M. Vestergaard, and E. Tamiya, "Electrochemical DNA Biosensors: Protocols for Intercalator−Based Detection of Hybridization in Solution and at the Surface," in *Biosensors and Biodetection*, vol. 504, no. 1, 2009, pp. 99–113.

[27] A. Venkatanarayanan, K. Crowley, E. Lestini, T. E. Keyes, J. F. Rusling, and R. J. Forster, "High sensitivity carbon nanotube based electrochemiluminescence sensor array," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 31, no. 1, pp. 233–239, Jan. 2012.

[28] N. Sato, "Electrode reactions in electron transfer," in *Electrochemistry at Metal and Semiconductor Electrodes*, Elsevier, 1998, pp. 235–288.

Abstract

Electrical Tunneling Biosensor for Detecting MMP-9 Using Concentric Electrode Device

JaeWoong Lee
Department of Electrical and Computer Engineering
The Graduate School
Seoul National University

An electrical biosensor based on the measurement of the electrical tunneling current modulation due to the cleavage action between the peptide and the MMP-9, the biomarker for a cancer, has been proposed and experimentally realized.

The Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is a core protease and material of cancer invasion and metastasis. In this work we use the specific peptide as the probe molecule for the MMP-9. The peptide substrate for MMP-9 labeled with Methylene blue (MB) immobilized on Au electrodes using thiol chemistry. MB is used as a redox reporter which enables the tunneling of electrons from Au electrode. After MMP-9 cleaved the MB labeled peptide fragment causing decrease in

the current caused by electron tunneling.

We used the cyclic voltammetry measurement and concentric electrode device. The concentric electrode which area of enclosing electrode much larger than island electrode. Therefore the self–gating effect of the biosensor with concentric electrode is able to provide a reliable electrical measurement without the reference electrode.

Our result shows that the limit of detection of this electrical tunneling sensor was about 5pM for the combination of MMP-9 and the specific peptide sequence of Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg-Cys. The platform may be extended to a general personal cancer diagnostic chip platform if a proper biomarker (other than MMP-9) with proper peptide sequence combination is given.

Keywords : MMP-9, methylene blue, peptide, concentric electrode, tunneling current

Student Number : 2014-21686