



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](#)

석 사 학 위 논 문

탄소나노튜브 소재를 활용한 듀얼  
항체기반 바이오 센서 개발

강 인 석

제주대학교 대학원

메카트로닉스공학과

2023년 8월

# 인체 장기칩 및 특허 동향에 대한 고찰 연구

이 논문을 메카트로닉스공학 석사 학위논문으로 제출함

강 인 석

제주대학교 대학원

메카트로닉스공학과

지도교수 최경현

강인석의 메카트로닉스공학 석사 학위논문을 인준함

2023년 06월

심사위원장	임종환	인
위 원	강철웅	인
위 원	최경현	인

# 목 차

LIST OF FIGURES .....	i
ABSTRACT .....	ii
II. 서론 .....	1
1. 탄소복합소재기반 바이오센서 개요 .....	3
1) 바이오센서 원리 및 연구동향 .....	3
2) 파킨슨병 연구배경 .....	4
III. 탄소나노튜브 기반 바이오센서 개발 .....	6
1. 탄소나노튜브 복합소재 개발 연구 .....	6
1) 3전극센서 원리 .....	6
2) 소재 혼합 및 소결조건에 따른 전기적 특성분석 .....	7
3) 전기화학 측정법을 이용한 센서 평가 .....	17
2. 바이오센서 표면 개질 방안 .....	18
1) 표면개질 및 항체고정화 연구 .....	18
2) 표면개질 후 전기적 특성 분석 .....	20
3. 파킨슨병 .....	23
1) 소변 엑소좀 추출 연구 .....	23
2) 파킨슨병 감지 .....	25
IV. 결 론 .....	26
참 고 문 헌 .....	27

# 탄소나노튜브 소재를 활용한 듀얼 항체기반 바이오 센서 개발

강 인 석

제주대학교 대학원 메카트로닉스공학과

## 요약

파킨슨병은 전 세계적으로 인정받는 중요한 노인성 질환으로 발병률이 급증해 주목받고 있습니다. 이러한 맥락에서 본 연구는 탄소나노튜브(CNT) 복합체를 이용한 바이오센서 개발을 통해 파킨슨병의 조기 진단 가능성을 모색하였습니다. 이 연구에서 우리는 파킨슨병 유전자 돌연변이인 DJ-1과 LRRK2를 목표로 하는 이중 항체 기반 바이오센서를 개발했습니다. 이는 CNT의 뛰어난 전기적 특성을 활용하여 센서의 성능을 극대화하는 데 초점을 맞췄습니다. 실험에서는 다양한 CNT 복합재료의 혼합비율을 실험하였고, 이를 통해 면저항을 7.78 ohm/sq로 낮추는 데 성공하였습니다. 이것은 센서의 성능을 향상시키고 파킨슨병 바이오마커를 정확하게 감지하는 데 중요한 역할을 했습니다. 또한 본 연구에서는 센서 표면개질을 통해 센서의 성능을 향상시키고자 했습니다. 이 방법은 센서의 정확도와 안정성을 높이는 데 성공했습니다. 본 연구 결과, 일반인을 대상으로 실시한 항체 측정에서는 DJ-1의 경우 10-15 ng/mL, LRRK2의 경우 18-31 ng/mL 범위의 결과가 얻어졌습니다. 이것은 탄소 나노튜브 기반의 바이오센서가 파킨슨병의 조기 진단을 위한 효과적인 도구로 사용될 수 있음을 보여줍니다. 따라서 본 연구는 CNT 물질을 이용한 바이오센서의 개발이 파킨슨병과 같은 노인성 질환의 조기 진단에 중요한 역할을 할 수 있음을 증명하였습니다. 이는 파킨슨병 등의 진단에 활용될 가능성을 시사하며, 보다 정확하고 빠른 질병 진단 방법 개발에 기여할 것으로 기대됩니다.

## I. 서 론

파킨슨병은 고령화 사회에서 점차 증가하는 3대 노인성 질환 중 하나로, 전 세계적으로 발생률이 증가하고 있는 중요한 건강 문제이다. 파킨슨병의 증상은 서동증, 안정 시 떨림, 운동장애 등의 증상이 나타난다. 파킨슨병을 조기에 발견하여 치료를 진행 할 경우 그렇지 않은 환자에 비하여 좋은 예후를 보이나, 이 질병은 퇴행성 특성으로 인해 발생 시점을 명확하게 파악하기 어렵고, 진단과 치료에도 여러 어려움이 따른다. 따라서 파킨슨병의 조기 진단과 효과적인 치료 방법 개발은 중요한 과제로 부각되고 있다.[1] 파킨슨병의 병인 중 일부는 유전적인 요인으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히, DJ-1 혹은 LRRK2와 같은 유전자의 돌연변이가 파킨슨병 발병의 주요 요인으로 추정된다. LRRK2는 효소 단백질로서 인산화효소와 GTPase 활성을 가지고 있다. 이 효소의 돌연변이를 가진 환자들은 다른 유전자 돌연변이를 가진 환자들과는 다른 발병 양상을 보이며, 높은 인산화효소의 활성을 나타낸다는 연구 결과가 있다. 또한 DJ-1은 산화스트레스 센서와 항산화제 역할을 수행할 수 있으며, 파킨슨병의 신경변성으로부터 도파민성 뉴런을 보호하기 위한 여러 매커니즘을 가지고 있다.[2] 이를 통해 DJ-1과 LRRK2 돌연변이는 파킨슨병 발병 기작에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.[3] 현재, 파킨슨병의 정확한 진단은 한 번의 신경학적 검사로는 어려운 경우가 많다. 또한, 진단 시점과 약물 치료의 효과를 연속적으로 모니터링하기 어렵기 때문에, 신뢰성 있는 진단과 치료 방법의 개발이 요구되고 있다.[4] 이러한 상황에서 파킨슨병을 진단하는 방법 중 하나로 떠오르는 것이 바이오센서이다. 바이오센서는 생체 유래 물질을 감지하고 분석하기 위해 사용되는 기술로, 생체 수용체와 대상 물질 간의 상호작용을 이용하여 대상 물질의 존재나 양을 측정하는 장치나 소자를 지칭한다. 바이오센서는 다른 진단기기에 비하여 사용하기 쉽고, 저렴하다. 그리고 측정 속도가 빠르고 다중 분석이 가능하다는 장점이 있다.[5] 이러한 장점으로 바이오센서는 다양한 질병 검출을 위하여 연구되고 있다. 최근 바이오센서 분야에서는 탄소나노튜브(Carbon Nano Tube, CNT)와 같은 혁신적인 소재가 활용되고 있다.[6] CNT는 그래핀으로 이루어진 원통형 물질

로, 생체 분자인 DNA나 단백질과 차원적 및 화학적으로 호환성이 뛰어나며, 생체적합성이 높다는 특징을 가지고 있다. 특히, CNT를 이용한 바이오센서는 주변 환경에 대한 전기 임피던스와 광학적 특성의 큰 변화를 나타낼 수 있는데, 이는 CNT 표면에 대상 물질이 흡착됨에 따라 발생한다. 적절한 센서 설계와 CNT 표면 개질을 통해 낮은 검출 한계와 높은 선택성을 달성할 수 있다. 이러한 특성을 활용하여 DNA와 구아닌과 같은 화합물 검출 센서가 개발되고 있다.[7] 또한, CNT를 이용한 바이오센서는 의료 분야에서의 실제 응용을 위해 미세 배열, 센서 개발, 바이오마커 검출 등 다양한 연구가 진행되고 있다.[8] 이러한 CNT 소재의 전기 화학적 특성을 이용하여 파킨슨병 외에 다른 질병 및 DNA 진단하기 위한 센서가 제작되고 있다. 이처럼 파킨슨병 조기 진단연구 및 바이오센서에 따른 연구가 이루어짐에도 불구하고 정확한 조기 진단을 위한 구체적인 방안이 나오지 않아 파킨슨병 조기진단을 위한 새로운 접근 방안이 필요하다. 본 연구는 탄소나노튜브 복합소재를 이용한 바이오센서의 파킨슨병 감지 가능성을 탐구하기 위해 DJ-1와 LRRK2를 대상으로 항체 검출실험을 수행하였다. 탄소나노튜브 복합소재를 이용하여 센서 제작을 위한 전도성 잉크를 만들고, 잉크젯 디스펜서를 활용하여 바이오센서를 제작하였다. 그리고 센서의 성능을 검증하기 위하여 Cyclic Voltammetry(CV)와 Electrical Impedance Spectroscopy(EIS)와 같은 전기화학적 분석 및 검정곡선을 활용하여 센서의 성능을 확인하였다. 이후 제작된 센서를 기반으로 표면 개질 및 항체 고정화를 통해 센서의 민감도를 향상시켰다. 항체고정화가 마무리된 센서는 파킨슨병이 걸리지 않은 국적, 성별, 나이가 겹치지 않은 8명의 대상자의 소변 샘플에서 DJ-1와 LRRK2를 측정하였다. 이를 통해 바이오센서의 민감도를 검증하고, 파킨슨병 검사 바이오마커의 검출 가능성을 확인하였다. 본 논문의 목적은 파킨슨병의 조기 진단 및 치료에 기여할 수 있는 CNT 기반 바이오센서의 가능성을 제시하는 것이다. 파킨슨병의 정확한 진단과 효과적인 치료 방법은 환자의 생활 향상과 질병 예방에 매우 중요한 요소이며, 이를 위해 더욱 발전된 바이오센서 기술과 연구가 필요하다. 따라서 본 연구의 결과는 향후 바이오센서의 개발과 파킨슨병 진단과 치료 분야에서의 의미 있는 기여를 기대할 수 있다.

### 1) 바이오센서 원리 및 연구동향

바이오센서란 생체유래 물질 감지 기술 중 하나로 독립적으로 통합된 수용체 변환기 장치로서 생물학적 인식요소를 이용하여 선택적 정량 혹은 반정량 분석 정보를 제공하는 장치로 IUPAC 권고에 명시되어있다.[9] 1962년 Clark가 당산화 효소와 산소 측정전극을 활용하여 개발한 글루코스 센서를 시작으로 화학, 전자, 생명 등 다양한 분야에서 연구되어 왔다.[10] 바이오센서의 원리는 일반적으로 산화 환원 반응을 기반으로 개발되어 왔으며, 세대가 거듭됨에 따라 조금씩 변경된다. 바이오센서의 가장 대표적인 측정 방식인 효소 바이오센서의 원리는 다음과 같다. 최초로 개발된 1세대 바이오센서에 경우 효소가 변환기 표면에 고정되어 있어 산화효소와 탈수소효소 두 가지 효소에 의존하여 측정이 진행된다. 두 효소를 이용하여 시료 내 분석 대상물질은 전기적으로 측정 가능한 부산물로 변환하여 측정이 진행되는 원리이며 이 과정에서 산소 의존성이 높으며 간섭이 쉽고 오랜 사용으로 표면이 오염될 수 있다. 2세대 바이오센서는 1세대 바이오센서의 산소의존성을 낮추기 위하여 산화제를 전극과 효소 사이에서 전자 운반체로 이용한다. 산화제를 사용할 경우 저전위에서 작동이 가능하며, 1세대에 비하여 산소의존성과 외부 간섭이 줄어드는 장점이 있지만, 1세대 바이오센서에 비하여 안전성이 낮다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위하여 개발된 3세대 바이오센서는 효소와 전극이 직접적으로 전자 이동이 진행되어 우수한 선택성을 보이고 낮은 검출한계를 가지고 있다.[11, 12]

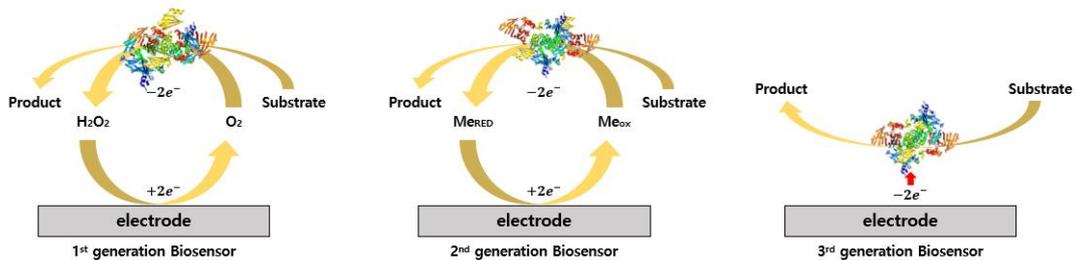


그림 1 세대 별 바이오센서 원리

또한 바이오센서는 금속 및 탄소와 같은 다양한 소재에 이용하여 센서 제작 연

구가 진행되고 있다. 그 중 탄소나노튜브 소재기반 바이오센서 연구는 1989년 weber는 탄소 섬유를 이용한 바이오센서를 제안하였으며, 병렬배열의 구조로 이루어진 탄소섬유는 높은 신호 대 잡음비를 보였다. 또한 1996년에는 두 가지 이상의 재료를 혼합한 전도성 복합체를 이용하여 개별 특성과 다른 화학적, 기계적 특성을 부여하였다. 이 연구를 바탕으로 같은 해인 1996년 죽매와 효소가 흡착된 금속복합소재 기반 작업전극을 개발하였다.[13] 또한 2007년부터 2018년까지 ‘탄소나노튜브 바이오센서’에 대한 논문은 4150개 이상의 색인화된 보고서가 있어 현재까지도 연구가 활발하게 이루어지고 있다.[14] 탄소나노튜브 기반 바이오센서는 주위 환경에 따라 전기 임피던스와 광학특성이 크게 변화한다. 적절한 센서 설계를 가정할 경우 CNT 표면은 낮은 검출한계와 높은 선택성을 얻을 수 있다. MWCNT는 복합재와 혼합하여 사용 할 경우 10wt%에서 약  $10,000\text{ S m}^{-1}$ 의 높은 전기전도도를 보인다.[15] 탄소나노튜브의 생체적합성에 경우 정제되지 않은 상태에서는 체내·외에서 약간의 독성이 검출되었으나 정제 된 탄소나노튜브에 경우 폐, 피부, 신경과 같은 체내·외 세포에서 독성이 적거나 검출되지 않았다. 이를 통해 현재의 탄소기반 생체재료는 뛰어난 생체 적합성을 명확하게 보여주어 탄소나노튜브의 특성이 생물의학 장치에서 안전하고 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 예상된다.[16]

## 연구배경

파킨슨병은 3대 노인성질환 중 하나로 꼽히는 질병으로 전 세계적 고령화에 따라 발병률이 증가하여 2040년에는 약 1420만 명의 환자가 발병 할 것으로 예측된다.[17] 파킨슨질병은 조기 발견하여 치료를 진행 할 경우 진행속도를 늦출 수 있으나,[18] 퇴행성 질환의 특성 상 발생시점이 모호하여 발생률 및 유병률을 명확하게 제시하기에 어려움이 있다. 또한 진단은 한 번의 신경학적 검사만으로 힘들고, 약제에 대한 반응과 병의 진행 등을 연속적으로 측정이 이루어져 발생 시점을 파악하기 어렵다. 파킨슨병은 뇌간의 흑색질에 존재하는 도파민성 신경세포의 소실로 인해 신경전달물질인 도파민이 부족하여 발생하는 질병이다. 파킨슨병 중 5~10%는 유전자의 돌연변이가 원인인 유전병으로 나타나는 것으로 알려져 있으며, 그 유전인자로 다양한 단백질이 밝혀져 있다.[19]

LRRK2에 경우 우성 유전형으로 가장 빈번하게 나타난다. LRRK2는 인산화효소와 GTPase

기능이 있는 효소단백질이며, LRRK2 돌연변이를 가진 환자의 증상이 다른 파킨슨병 유전자 돌연변이를 가진 환자와는 달리 산발적 발병환자의 증상과 유사하고, 발병 돌연변이인 인산화효소의 활성이 높은 것으로 관찰되었다. [20] LRRK2 돌연변이는 GTPase 도메인의 R1441C, kinase 도메인의 I2012T, G2019S, I2020T 등 주로 이들 기능성 도메인에서 발견된다. 이는 이들 두 도메인이 LRRK2에 의한 파킨슨병 발병 기작의 주요 요소로 작용함을 시사한다. G2019S는 가족력이 있는 전체 파킨슨병 환자의 2~6%, 산발적인 환자의 1~2%에서 나타난다. 이 돌연변이는 나이에 따라서 발병도가 높아져 55세 이상에서 33%, 76세에는 100% 발병률을 보인다.[19] 열성 유전형 유전자에 경우 Parkin, DJ-1, PINK1, ATP13A2의 유전자가 있다. 이 중 DJ-1은 도파민 신경세포의 페이스 메이킹 활성화와 도파민 독성에 의해 생성된 산화스트레스로부터 세포를 보호함으로써 미토콘드리아의 칼슘플럭스를 조절하는 데 중요한 역할을 하며, 파킨슨병의 주요 메커니즘 중 하나인 미토콘드리아 기능의 장애를 일으킨다. [21] 이러한 데이터를 기반으로 파킨슨병 검사 바이오마커 LRRK2와 DJ-1을 바이오센서의 타겟으로 설정하였으며 검사 연구를 진행하였다.

### Ⅲ. 탄소나노튜브 기반 바이오센서 개발

#### 1. 탄소나노튜브 복합소재 개발 연구

##### 1) 3전극 센서 원리

전기화학적 방법을 이용한 효소 바이오센서는 특정물질과 반응물질 층을 표면에 고정화시키고 검출대상물과의 반응으로 인한 물리,화학적 변화를 검출하는 방식이다. 주로 산화-환원 반응을 이용한 amperometric, potentiometric, conductometric, capacitive 방식으로 검출하는 방법이 이용되어왔다. [22] 전극 전위에 대한 전기화학적 연구는 일반적으로 3전극 구성을 사용한다. 그림7은 일반적으로 사용되는 3전극 시스템을 나타낸다. 3전극 시스템에서 전위는 작업전극(Working electrode)에서 측정이 이루어진다. 전류는 상대전극(Counter electrode)에서 작업전극으로 공급되며, 상대전극은 주입되는 전류의 양에 따라 변하므로 전극 전위를 측정할 수 없다. 상대전극을 통해 일정한 전류가 인가되면 기준전극(Reference electrode)이 용액에 도입되며 이를 기준으로 작업전극의 전위 혹은 전류를 판독할 수 있다.

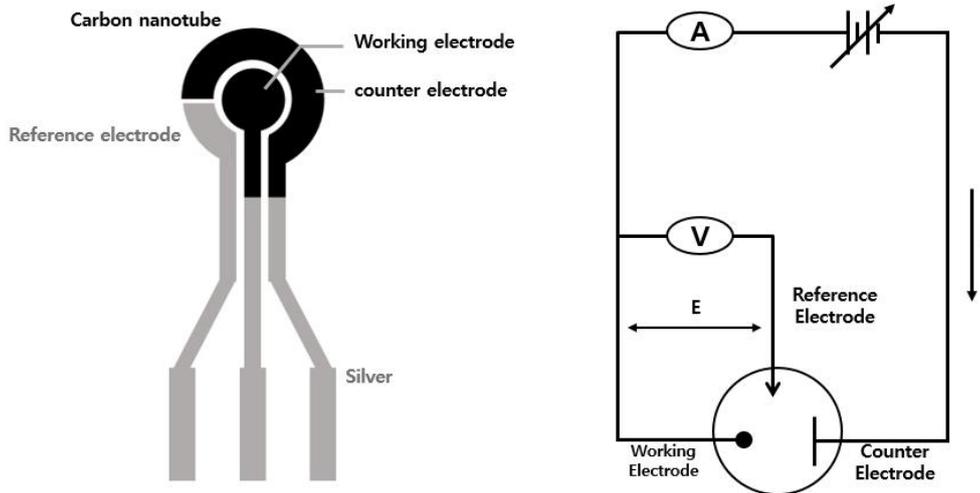
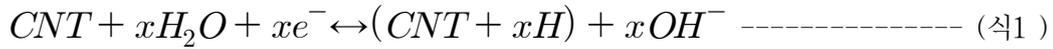


그림 2 3-전극 센서의 구조 및 회로도

작업전극과 상대전극 사이에 정전류를 인가하고 작업전극과 기준전극 사이에 전위차를 측정하였으며 충전 및 방전주기는 다음 식1과 같다.[23]



기준 전극은 주로 작업전극과 상대전극의 소재와 다른 소재를 사용하며, 본 연구에서 기준전극으로 사용한 은(Ag) 전극은 구조가 단순하여 연구 및 산업 분야에서 가장 대중적으로 사용되는 전극으로 KCl과 같은 Cl<sup>-</sup> 이온이 다량 함유된 용액에 담길 경우 다음 식2와 같이 분리가 된다.



식2에 따르면 염소 이온은 전극의 작동에 있어서 화학종으로 작용하며 작업전극에 영향을 미친다. 각 전극의 전위는 네른스트(nernst) 방정식을 만족한다.[24]

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln(Q) \text{ ----- (식3)}$$

## 2) 소재 혼합 및 소결조건에 따른 전기적 특성분석

CNT 바이오센서의 소재는 CNT와 PEDOT:PSS를 혼합하여 제작되었다. CNT 소재는 다층구조(MWNTs)로 이루어졌으며, 9.5nm의 직경과 1.5um의 길이를 가지고 있다. 또한 CNT와 혼합하여 사용하는 PEDOT:PSS는 가장 광범위하게 연구되는 유기열전 재료 중 하나로 상온에서 높은 전기 전도율을 가지고 있으며, CNT 표면의 PSS 입자는 전기적으로 접합부를 연결하는 역할이 가능하다. CNT와 PEDOT:PSS의 혼합 비율에 따라 전기 전도율이 크게 변화하기 때문에 혼합 비율에 따른 전기적 특성 분석이 필요하다.[25] 혼합 조건은 표4와 같이 Sonicator를 이용하여 Pulse on 5sec, Pulse off 2sec 반복으로 1시간동안 혼합 후 마그넷 스틸러를 이용하여 40도의 온도에서 12시간동안 추가 혼합이 이루어

졌다. CNT : PEDOT:PSS 의 혼합 비율을 최소 1:2비율부터 최대 1:4 비율로 혼합하였으며, 제작된 CNT solution을 DMA와 혼합하여 각 용매의 비율에 따른 면저항과 점도를 측정하여 최적의 혼합비율을 도출하였다. 점도는 회전식점도계 (viscolead one)를 사용하여 측정하였으며, 저항측정은 절연저항 측정기(Desk Top RS Type, FPP-RS 8)을 이용하여 측정을 진행하였다.

표 1 잉크 혼합 비율 별 저항측정 공정변수

노즐 사이즈	300 $\mu$ m
혼합 비율	1:2 ~ 4
혼합 시간	Sonicator 1hr magnetic stirrer 12hr
경화 조건	150 $^{\circ}$ C, 1hr

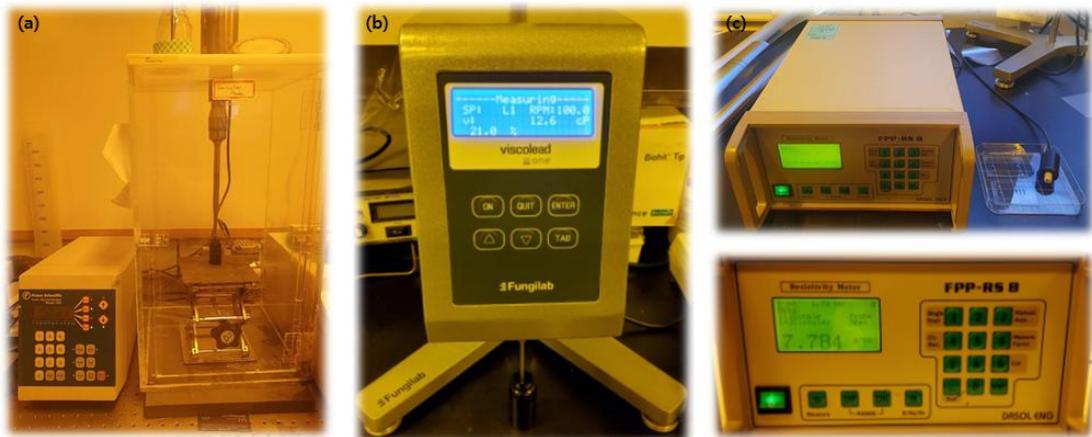


그림 3 잉크 혼합, 점도, 면 저항 측정기기 (a) Sonicator, (b) 점도 측정기, (c) 면 저항 측정기

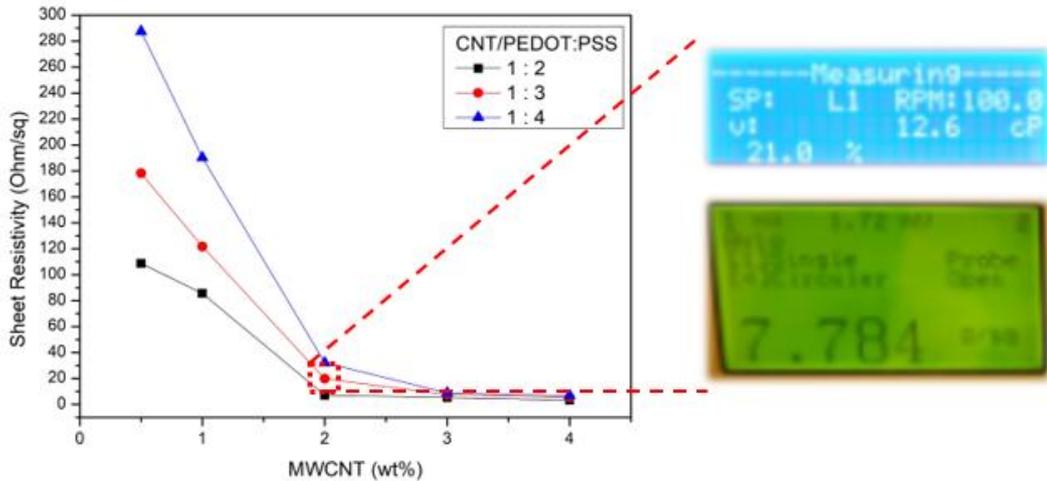


그림 4 탄소나노튜브 혼합 비율에 따른 면 저항 측정 결과

혼합 결과 면저항에 경우 CNT와 PEDOT:PSS의 혼합 비율에서 PEDOT:PSS의 비율이 높을 경우 저항과 점도가 낮게 측정되었으며, 저항에 경우 CNT solution의 비율이 DMA 대비 2wt%가 넘을 경우 비율 별 차이는 크게 나타나지 않았다. 하지만 점도에 경우 비율에 따른 차이가 크게 나타났으며, 기존 잉크정량토출 시스템에서 주로 사용되는 잉크의 점도와 비슷한 12.0cP의 1:3 비율로 제작되었다.

표 2 선폭제어 공정변수

노즐 사이즈	300 $\mu$ m
이격 거리	80 $\mu$ m
토출 공압	0.1~0.3 kpa
프린팅 속도	5mm/s

바이오센서의 선폭 제어를 위해 토출 공압 별 패터닝 분석 실험을 진행하였으며, 표5와 같이 이격 거리, 프린팅 속도를 고정변수로 설정하였고, 노즐사이즈(300~500  $\mu$ m), 토출 공압(0.1~0.3kpa)을 조건변수로 설정하였다.

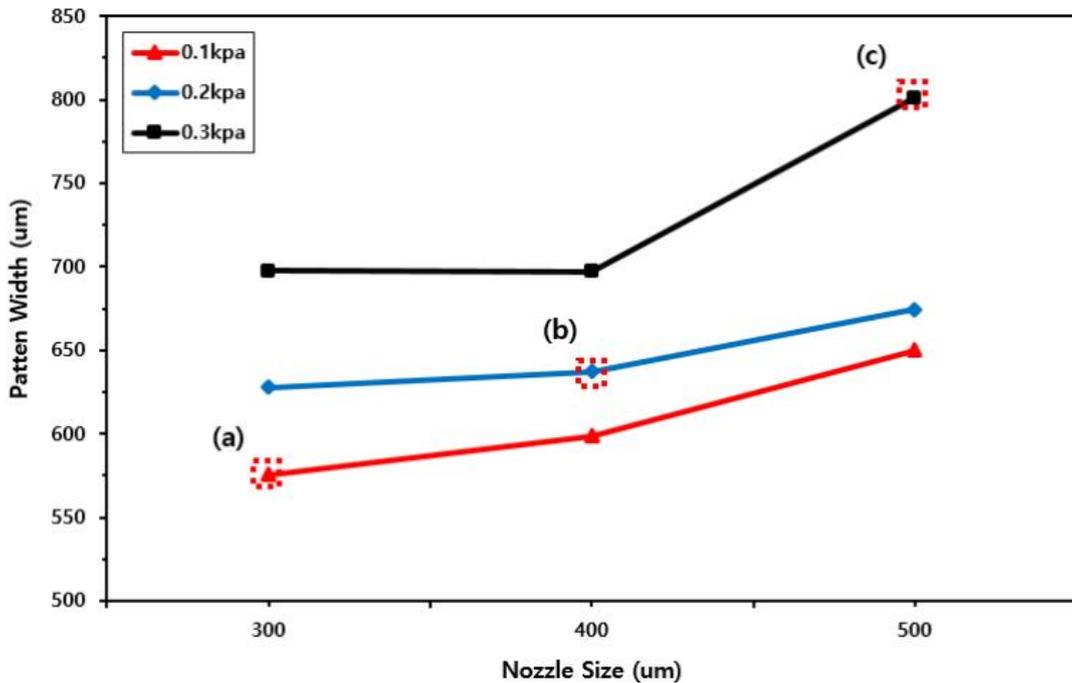


그림 5 노즐 사이즈 및 잉크 토출 공압에 따른 선폭 측정

그림10은 토출 공압과 노즐 사이즈에 따른 센서 선폭 두께측정 결과이다. 동일한 조건에서는 토출 공압이 높을수록, 동일한 공압에서는 노즐 사이즈가 높을수록 선폭이 비례하게 증가하는 경향을 보였다. 노즐 사이즈보다 토출 공압에서 더 높은 변화량을 보였으며, 0.1kpa 토출공압과 300um 노즐에서 최소 선폭 575.5 $\mu$ m, 0.3kpa 공압 및 500um 노즐 사이즈에서 최대 선폭 801.1 $\mu$ m의 결과를 얻었다. 잉크의 점도가 높아 0.1kpa 미만의 공압 혹은 300um 미만의 노즐에서는 잉크가 원활하게 토출되지 않았으며, 0.4kpa 이상의 공압 혹은 600um 이상의 노즐에서 잉크의 토출량이 급격하게 늘어나 선폭을 측정할 수 없었다.

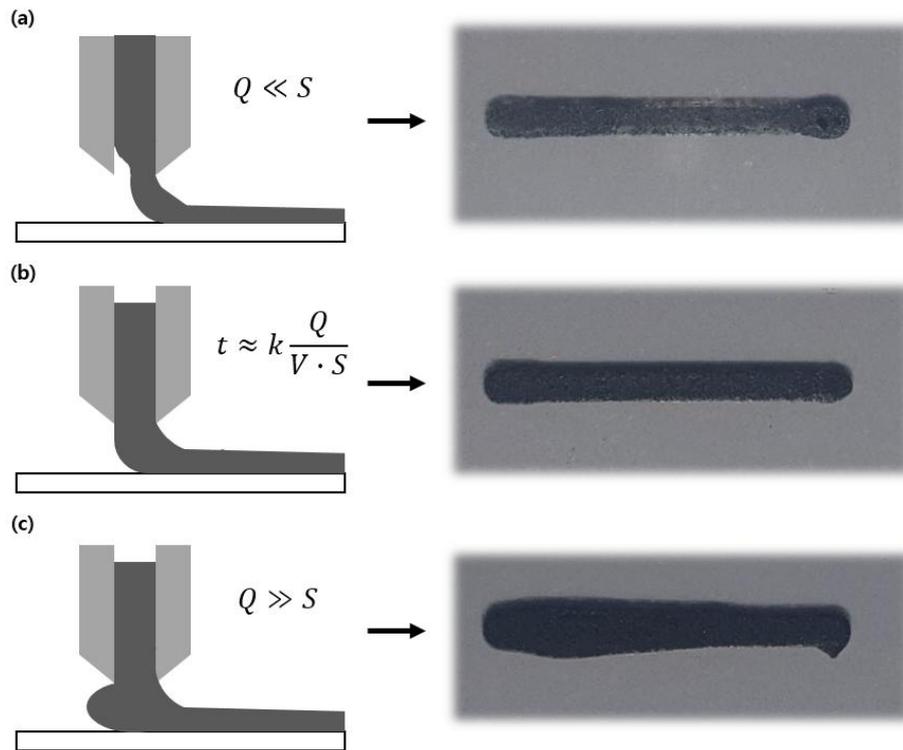


그림 6 노즐 사이즈 및 토출 유량에 따른 선폭 측정

그림 12는 토출 공압 별 센서의 선폭을 이미지로 측정하였다. 0.4kpa 이상일 경우 노즐의 범위 밖으로 잉크가 퍼져나가 균일한 선폭을 유지할 수 없으며, 0.1kpa 이하의 공압에서는 선폭이 줄어들었다. 또한 CNT 잉크의 토출이 원활하지 않아 내부 기공이 눈에 띄게 증가하였다. 기공이 높을수록 먼 저항이 증가하기 때문에 선폭 제어를 위한 잉크 토출공압은 가장 균일한 선폭을 보인 0.2kpa로 선정하였으며, 노즐 사이즈는 제어가 비교적 간단한 400um의 사이즈를 선택하였다. 그리고 프린팅을 마친 잉크의 소결 조건을 확립하기 위하여 소결 조건에 따른 먼 저항 측정을 진행하였다.



그림 7 노즐 크기 및 잉크 토출공압에 따른 선폭 측정 결과 (a) 300um, 0.1kpa, (b) 400um, 0.2kpa, (c) 500um, 0.3kpa

소결 온도 별 경향을 확인하기 위하여 온도와 시간을 제외한 나머지 환경 변수를 제거하기 위하여 밀폐된 오븐에서 소결을 진행하였다. 소결 조건은 80℃, 120℃, 150℃ 세 가지 조건에서 각각 10, 30, 60분간 소결을 진행한 뒤 면 저항을 측정하였으며, 소결 결과 그림13과 같이 150℃에서 60분간 소결을 진행하였을 때 면 저항이 가장 낮게 측정되는 것을 확인할 수 있었다.

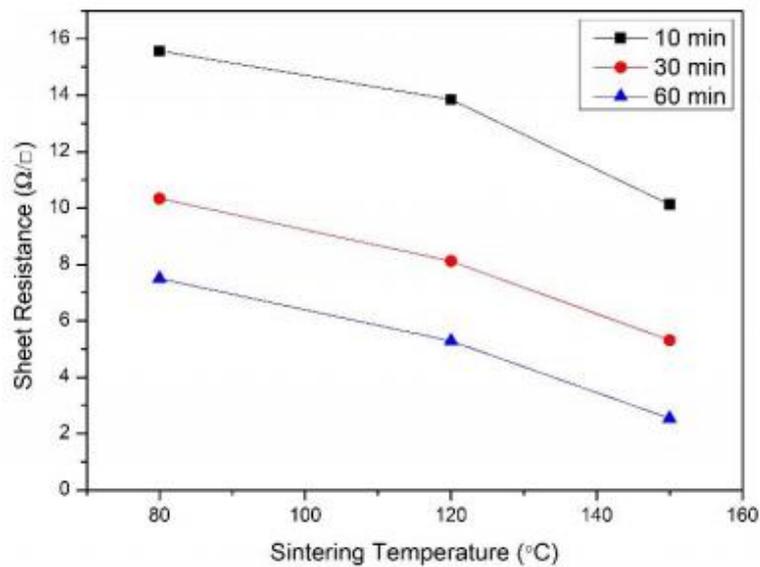


그림 8 시간 및 온도에 따른 면 저항 측정 결과

그림 13을 통하여 소결 시간과 온도가 높을수록 면 저항이 낮아지는 것을 확인할 수 있다. 하지만 그림14와 같이 마이크로스코프로 소결 된 센서의 표면을 측정하였을 때, 150℃이하의 온도에서 소결한 센서는 온도에 따른 센서 기공도의 변화

가 보이지 않으나 소결 온도가 200℃ 이상으로 올라가게 될 경우 DMA의 급격한 상태변화로 인하여 센서 표면 기공도가 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 기공도가 낮으며 면 저항이 적은 150℃온도에서 1시간동안 소결하는 것으로 조건을 확립하였다.

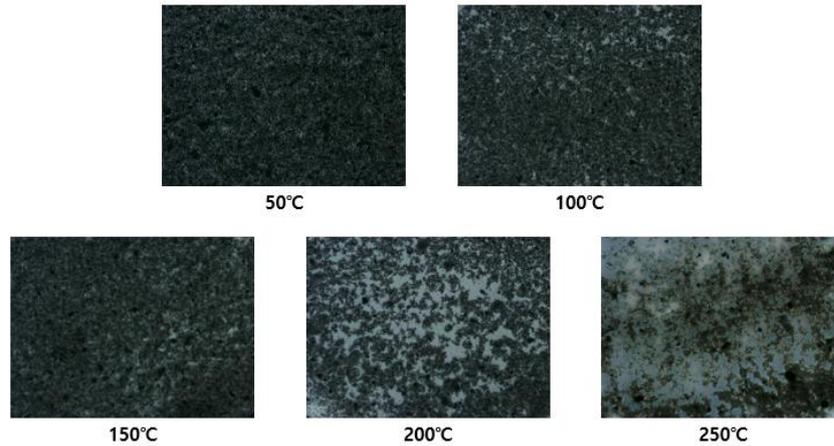


그림 9 소결 온도 별 센서 표면 측정

또한 CNT용액 제조과정과 CNT-Polymer 복합물질 제조과정에서 Ultrasonicator을 이용한 혼합 시간에 따른 CNT 정렬 변화를 측정하였다. 측정 방식은 SEM 이미지를 활용하여 30, 60, 90분 세 가지 조건을 기준을 측정을 진행하였으며, 측정 결과 혼합 시간이 늘어남에 따라 평균 CNT 길이가 짧아지는 현상을 확인할 수 있었다. CNT 길이가 짧아지게 될 경우 전기 저항이 증가함에 따라 전기전도도가 낮아지는 결과를 가져오기 때문에 Ultrasonicator을 이용한 CNT 소재 분산은 60분으로 공정조건을 확립하였다.

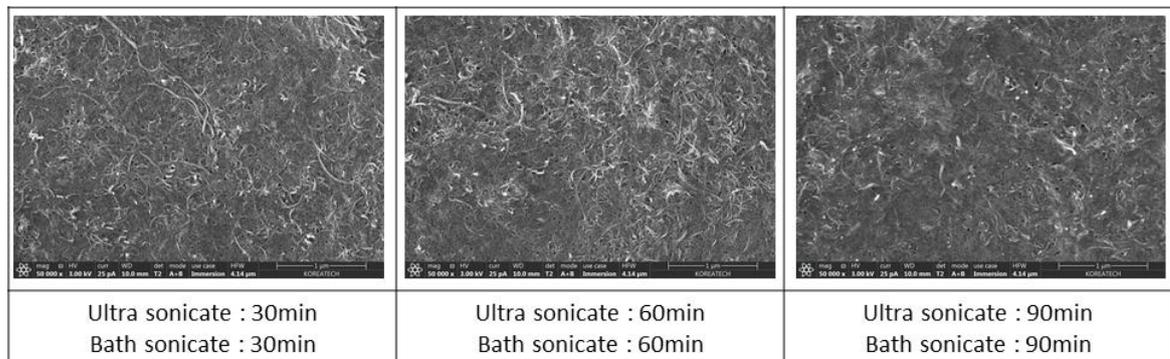


그림 10 Ultrasonicator 시간 별 SEM 이미지

FiB-SEM 이미지 측정을 통해 layer 별 센서의 두께를 확인하였으며, 면저항 측정 결과 1layer에서 최저 12.54ohm/sq, 2layer에서 최저 7.78ohm/sq의 결과를 확인할 수 있었다. 또한 2layer 기준으로 식4와 같이 패턴 두께(t), 면저항(ohm/sq)을 대입하여 센서의 전기전도도를 계산한 결과 전기전도도  $3.06 \times 10^5$  S/m을 확인할 수 있었다.

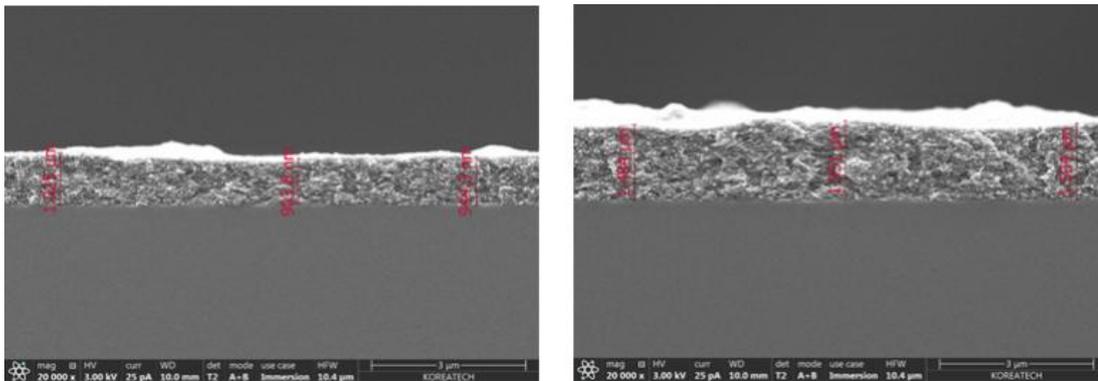


그림 11 센서 Layer 별 SEM 이미지

$$Conductivity(S/m) = \frac{1}{\frac{ohm}{sq} \times t} \text{ ----- (식 4)}$$

이와 같이 센서의 혼합 비율 및 소결, 혼합 조건 연구 결과를 기반으로 CNT 잉크 프로토콜은 그림17과 같이 진행되었다. 먼저 0.5g의 CNT와 25mL DMA를 혼합하여 2wt%의 CNT 혼합물을 제작하였으며 혼합물 내 탄소의 균일한 상태를 만들기 위하여 Ultra Sonicator을 이용하여 1시간동안 소재를 분산시켰다. 분산된 소재는 PEDOT:PSS 용액과 1:3 (CNT 혼합재 : PEDOT:PSS)비율로 혼합되어 사용되었으며, 혼합 후 자기교반기를 이용하여 실온에서 12시간이상 교반이 이루어졌다. 패터닝은 제작비용이 저렴하고 프로그래밍이 가능한 잉크젯 디스펜서 공정을 기반으로 진행되었다. 앞서 진행된 실험 결과를 바탕으로 공정조건은 CNT 복합물질 점도 12cp, 토출 공압 -0.3kPa, 노즐 사이즈 300um, 이격거리 80um 등의

공정 조건을 도출하여 패터닝을 진행하였다. 센서 패터닝에 사용된 유리기판에 경우 아세톤을 이용하여 표면을 세척하였다.

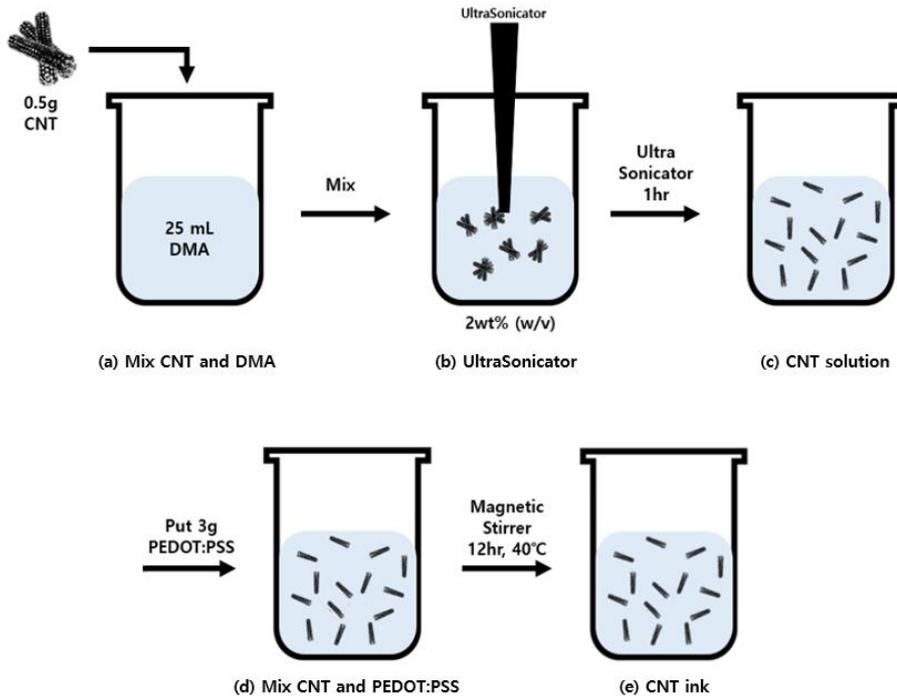


그림 12 CNT 잉크 제작 프로토콜

또한 제작된 CNT 복합소재 잉크 및 소결 조건에 대한 결과를 기반으로 센서 공정조건을 확립하였다. 확립된 조건은 그림19와 같다. 센서의 제작 방식은 먼저 센서를 부착 할 유리기판을 히팅플레이트를 이용하여 50℃로 가열시킨 뒤 CNT 잉크를 1차 적층 한다. 1차 적층이 마무리된 기점으로 5분 후 센서 회로 내 기공을 줄이기 위하여 2차 적층을 진행한다. 2차 적층은 1차 적층 이격거리(80um)에서 20um를 추가로 이격하여 진행하였다. 적층이 완료된 센서는 150℃ 오븐에서 1시간동안 경화를 진행하였다. 탄소나노튜브 경화가 완료된 후 실버잉크를 사용하여 기준전극 및 커넥터 프린팅을 진행하였다. 기준전극 및 커넥터 프린팅에 사용된 실버 잉크(InkTec, TEC-DA-030)는 약 18cp의 점도를 가지도록 혼합하여 사용되었으며, 제조사의 권장 소결조건인 130℃의 온도에서 20분간 소결이 진행되었다.

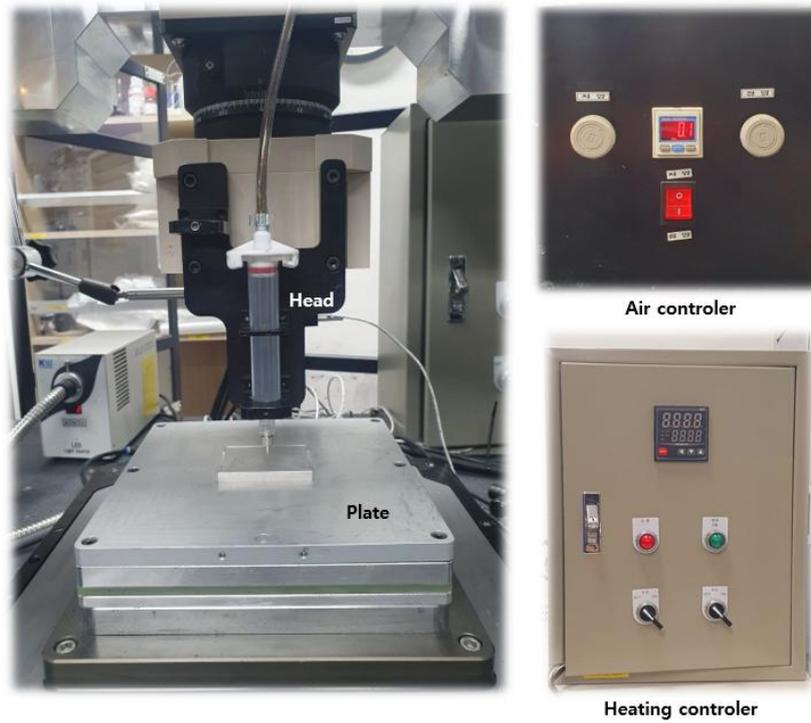


그림 13 잉크젯 디스펜서 장비

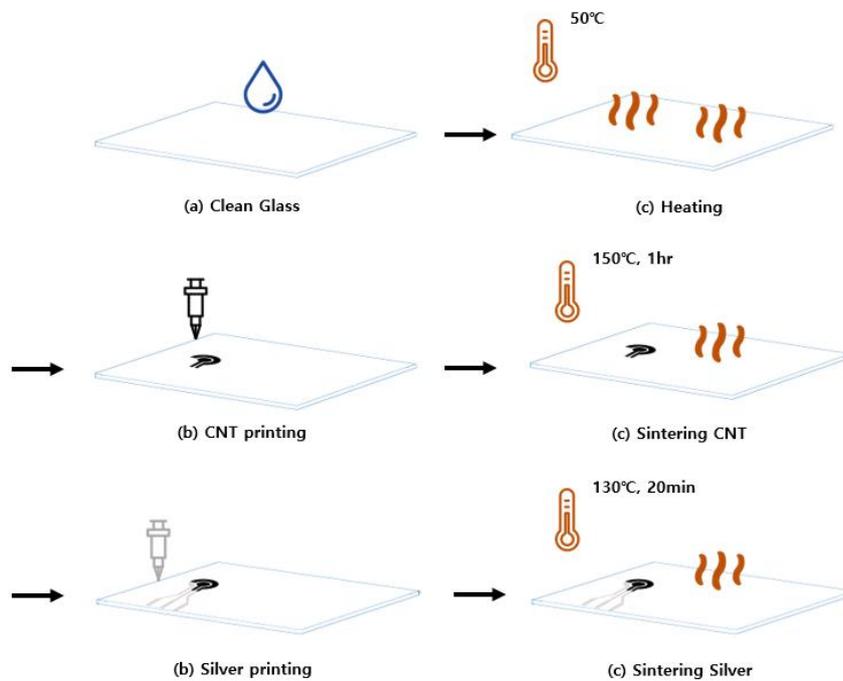


그림 14 센서 제작 프로토콜

### 3) 전기화학 측정법을 이용한 센서 평가

제작된 센서의 안정성을 확인하기 위하여 그림 20과 같이 PalmSens4를 통하여 순환전압전류법(CV)으로 전압과 전류의 변화를 측정하였다. 측정에 사용된 용매는 염화칼륨(KCl) 100mM과 페로시아화칼륨[ $K_4(Fe(CN)_6)$ ] 10mM을 1:1 비율로 희석하여 사용되었다. 스캔속도는 0.2 V/s이며, -0.4 ~ 0.6V의 전위 범위에서 측정을 진행하였다. 3회 연속으로 측정하여 그림과 같이 CV 그래프에서 산화 환원 용매를 이용한 전극의 반응을 확인하였다. 그림과 같이 센서의 가역성을 보이는 것을 통해 전극의 안정성이 좋다는 것을 확인할 수 있었다.



그림 15 CV 측정 조건 및 장비, 센서 연결

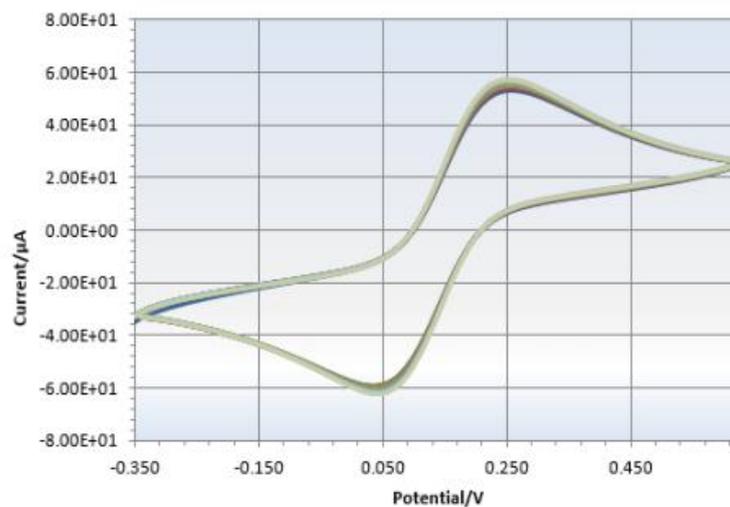


그림 16 Cyclic Voltammetry 결과

## 2. 바이오센서 표면개질 방안

### 1) 표면개질 및 항체고정화 연구

항체 고정화 전 센서 표면 항체 결합이 용이한 상태로 변경하기 위하여 표면개질을 진행하였다. 표면개질에 사용된 주 용매는 3-Mercaptopropionic acid(MPA), 6-Mercapto-1-hexanol(MCH), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDC), N-Hydroxysuccinimide(NHS) 등이 사용되었다. 각 용매의 역할은 다음과 같다. MPA는 효소 고정화의 앵커역할을 하는 얇은 유기층(carboxyl, 카르복실기)을 형성하는 역할을 하며 작업전극에 자가 조립되어 사용된다.[26] EDC는 카르복실기와 아민 사이에 아미드 결합을 형성하는 수용성 가교제로 카르복실기와 반응하여 중간체(O-acylisourea)를 생성하는 역할을 하지만 중간체는 산소원자가 친핵성으로 작용하고 가교제를 비활성하기 때문에 물에서 매우 불안정하여 아민과 반응하지 못한 중간체는 가수분해 된다. 이 문제를 해결하기 위하여 NHS는 EDC를 통해 만들어진 반응하지 못한 중간체와 반응하여 안정적인 상태를 유지시켜준다.[27, 28] MCH는 남은 Bare 영역을 차단하여 전극 표면에서 발생하는 비특이적 결합을 감소시키는 역할을 한다. 이를 통하여 유효 면적이 감소하고 피크 전류가 감소할 수 있다.[29] 항체를 고정화하기 전 센서의 성능을 먼저 확인하기 위하여 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)을 실시하였다. 표면개질에 사용되기 전 각 용매는 목적에 맞는 몰농도로 희석되어 사용되었으며, 희석 방법은 MPA에 경우 에탄올과 증류수를 1:1 비율로 희석한 9.9mL 용매에 MPA 100uL를 희석하여 1mM MPA를 제작하였다. EDC는 10mL의 1xPBS와 764mg의 EDC 분말을 희석하여 제작되었으며, NHS는 20mL의 1xPBS와 115ng의 NHS 분말을 혼합하여 만들어졌다. 마지막으로 사용된 MCH에 경우 100mM의 MCH와 9.90mL의 1xPBS와 100uL의 MPA 용매를 혼합하여 1mM의 MCH를 제작하였다. 표면개질의 순서는 그림과 같이 진행되었다. 먼저 제작된 CNT 센서의 표면을 증류수를 이용하여 세척을 진행하였으며 12시간 이상 실온에서 건조하였다. 이후 1mM MPA 5uL를 작업전극에 4°C의 온도에서 1시간동안 도포하여 카르복실기 결합을 형성하였다. 이후 제작된 40mM

EDC와 10mM NHS 용액을 1:1 비율로 혼합하여 작업 전극에 5uL 도포하였으며 실온에서 12시간동안 카르복실기와 아미드결합을 진행하였다. 이후 DJ-1과 LRR K2 항체를 각각 3uL씩 작업전극과 상대전극에 도포하여 4°C에서 12시간동안 항체를 고정화 시켰다. 마지막으로 1mM MCH를 작업전극에 1시간동안 도포하였으며 1x PBS로 반응하지 않은 용매를 제거하였다. 작업이 끝난 센서는 2~8°C의 환경에서 보관되었다.

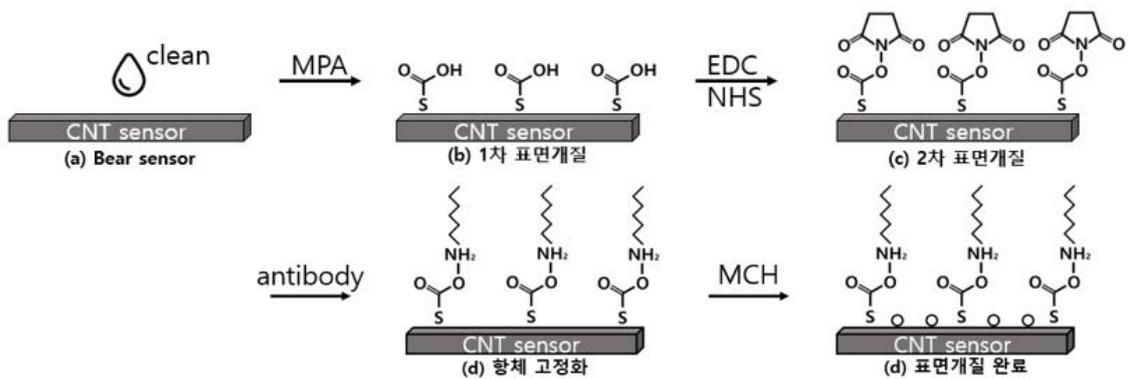


그림 17 센서 표면개질 프로토콜

항체 고정화 전 센서의 성능을 판단하기 위하여 electrical impedance spectroscopy(EIS) 측정을 통해 나이퀴스트 선도(Nyquist plot)를 도출하여 센서의 민감도를 확인하였다. EIS는 전기화학 검출방법 중 하나로, 10kHz에서 10MHz의 주파수를 스위핑을 사용하여 물질의 전도도를 측정하는 방식이다. 이 방식은 주로 생체분자나 세포를 감지하는 데 사용되며 넓은 주파수 범위로 작동하여 낮은 농도에서 높은 민감도를 보이는 방식으로 동일한 조건상에서 표면개질이 완료된 센서와 bare 센서를 측정하여 비교하였다.[30]

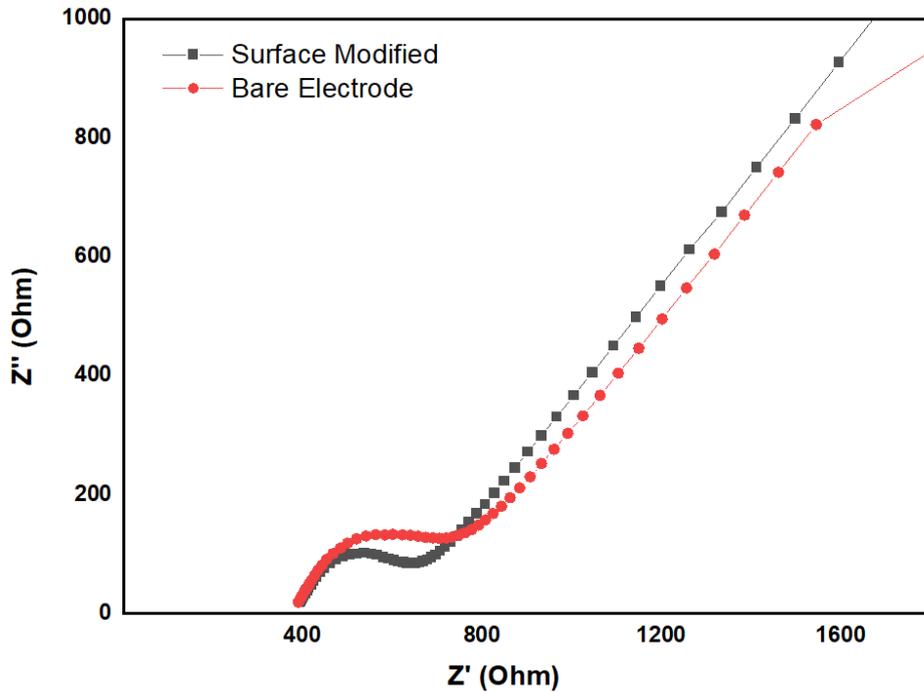


그림 18 표면개질 후 나이퀴스트 선도

측정 결과 표면개질이 진행된 센서는 Bare 센서에 비하여 낮은 민감도를 보이고 있는 것을 확인할 수 있다. 이는 앞서 언급한 것처럼 항체를 고정하지 않은 상태에서 MCH 용매가 비특이적 결합을 방지하기 위해 전극을 차단하여 생긴 결과로 판단된다.

## 2) 표면개질 후 전기적 특성 분석

고정화가 마무리 된 센서를 기반으로 센서의 검출한계를 구하기 위하여 항체 농도에 따른 전류값 측정을 진행하였다. 항체 농도는 DJ-1에 경우 5ng ~ 5ug, LRRK2는 500pg ~ 500ng의 농도에서 샘플을 측정하였다.

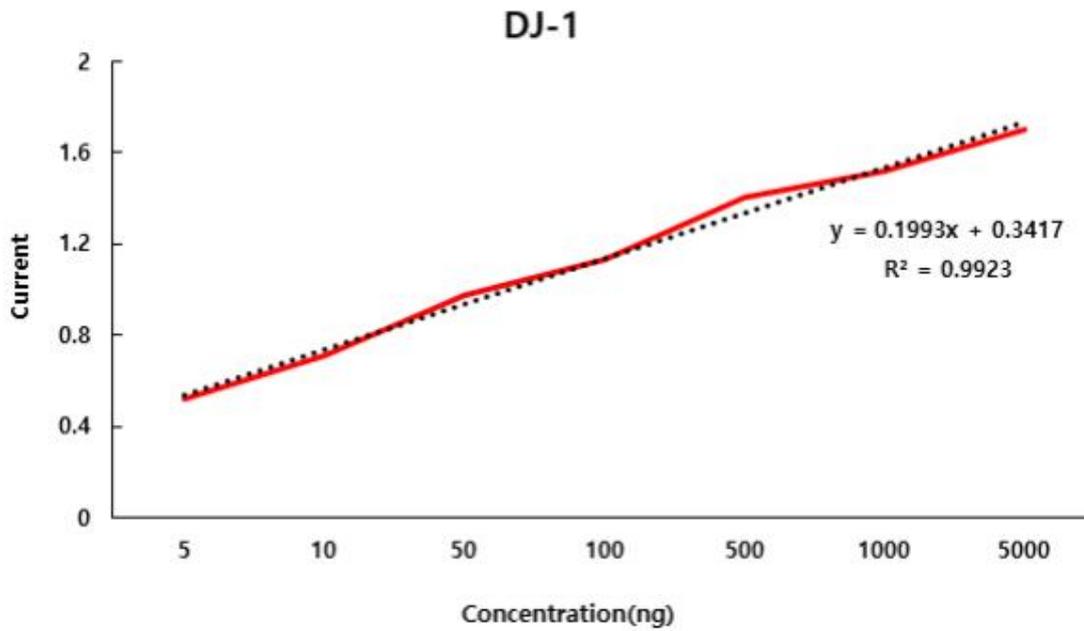


그림 19 DJ-1 항체 고정화 센서 검정곡선

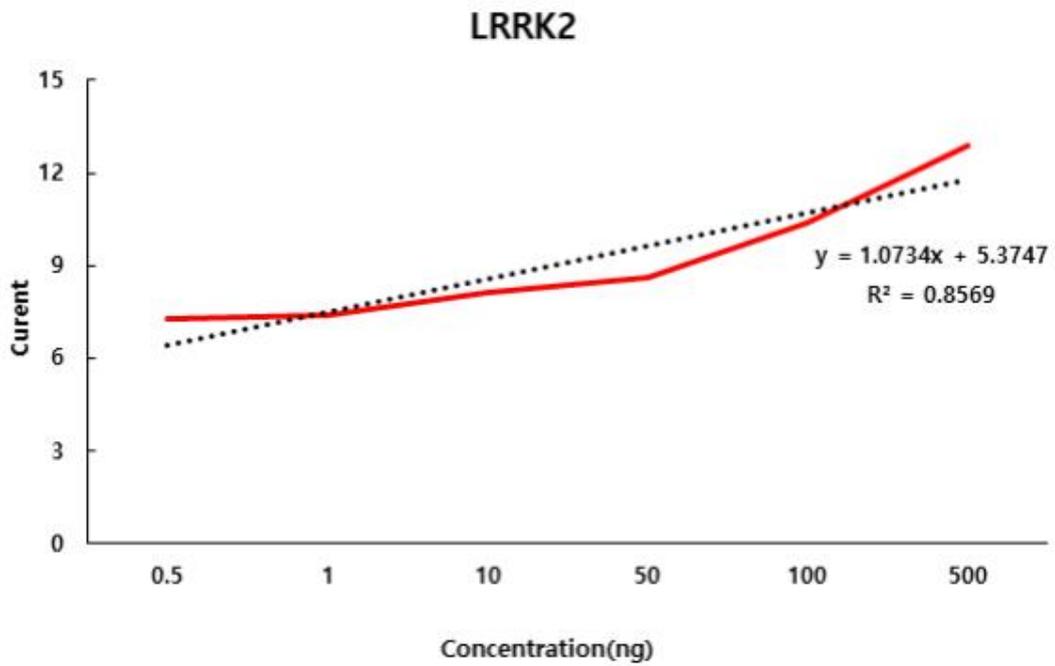


그림 20 LRRK2 항체 고정화 센서 검정곡선

측정 결과를 기반으로 엑셀에 추세선 기능을 활용하여 다음과 같은 수식을 구하였다. DJ-1은  $y = 0.1993x + 0.3417$ 이며, LRRK2는  $y = 1.0734x + 5.3747$ 의 검정곡선 값을 얻었다. 이 값을 기반으로 다음 식5을 이용하여 각 항체에 따른 Limit Of Detection(LOD, 검출한계)을 도출을 하였다.

$$DL = 3.3\sigma/S \text{ ----- (식 5)}$$

여기서  $\sigma$ 는 감응의 표준편차를 의미하며, S는 검정곡선의 기울기이다. 위 식을 대입하여 LOD를 도출 할 경우 DJ-1에 경우  $\sigma=1.0734$ ,  $S=0.400177$  값을 대입하여 LOD는 약 8.851ng이 나오며, LRRK2에 경우  $\sigma=1.98024$ ,  $S=0.1993$  값을 대입하여 LOD는 약 0.332ng을 도출할 수 있다. 또한 고정화가 완료된 센서의 민감도를 확인하기 위하여 EIS 측정을 하였으며 그림26 과 같은 결과를 도출하였다.

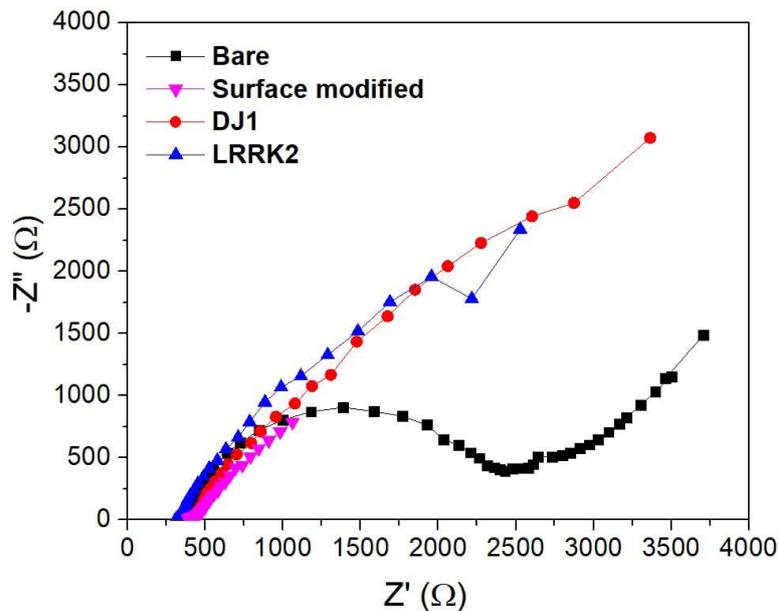


그림 21 항체 고정화 후 나이퀴스트 선도

측정 결과 앞서 표면개질 후 측정된 EIS와 같이 항체를 고정하지 않고 진행하였을 때 Bare보다 낮은 민감도를 보이니 항체 고정화 후 측정 결과는 Bare 센서에 비하여 높은 민감도를 가지고 있는 것을 확인할 수 있다.

## 2. 파킨슨병

### 1) 소변 엑소좀 추출 연구

센서 성능 검증을 위하여 제작된 센서를 기반으로 소변을 통해 엑소좀을 추출하여 DJ-1과 LRRK2를 추출하여 파킨슨질병 유무에 대한 측정을 진행하였다. 엑소좀은 지름이 약 40 ~ 160nm 범위의 세포외 소포이며, 혈장 막의 순차적인 흡인을 통해 다른 세포내 소포와 교차하여 엑소좀의 다양성에 기여한다. 엑소좀을 포함한 세포내 소포는 기원에 따라 DNA, RNA, 지질, 대사물 등 다양한 구성요소를 포함할 수 있다.[31]

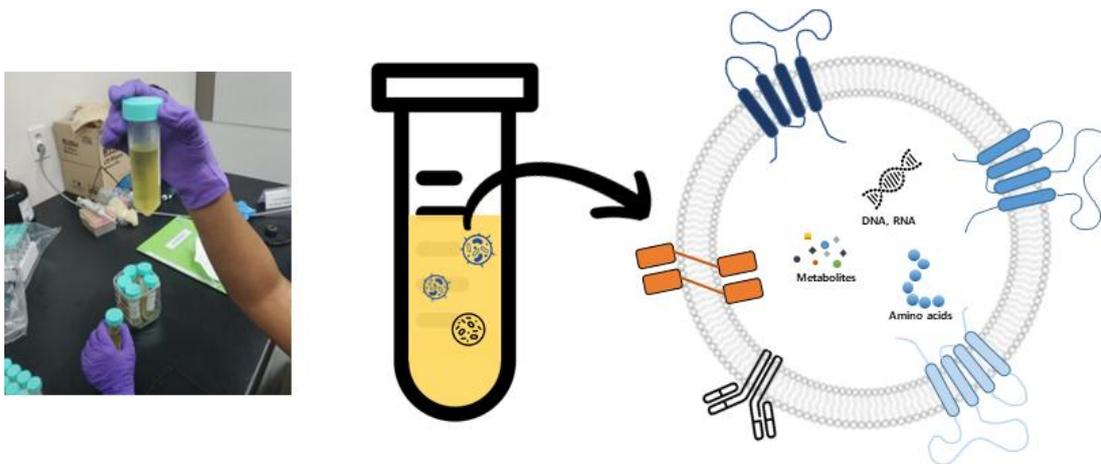


그림 22 Urinary Exosome

여러 연구에 따르면 산화된 DJ-1 형성은 산화 스트레스에 의해 유도되어 파킨슨병의 바이오마커가 될 수 있다. 또한 한국 남성 파킨슨환자의 소변 엑소좀에서 산화 DJ-1 수준이 일반인에 비하여 높은 값을 나타낼 수 있다고 추정된다.[32] LRRK2는 질병과 관련이 있을 뿐만 아니라 임상진단 테스트에서도 테스트 가능한 조직과 생물학적 유도체에서도 발견된다. 예를 들어 파킨슨 환자의 전두엽 피질에서 LRRK2 단백질 수준이 대조군에 비하여 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 총 LRRK2 발현 증가가 파킨슨병과 관련이 있음을 알려주게 된다.[33] 이를 통해 센서를 활용한 DJ-1 및 LRRK2 측정을 통하여 파킨슨병 검출이 가능할 것으로 판단되며, 검출을 통해 센서의 성능을 검증하려 한다. 소변을 통해 DJ-1과 LRRK2 항체를 추출한 과정은 다음과 같다.

나이, 국적, 성별이 상이한 8명의 시험 대상자의 소변 샘플은 아침 첫 번째 혹은 두 번째 소변을 확보하여 실험을 진행하였다. 소변의 양은 최소 200mL 이상이다. 소변 채취 직후 프로테아제 억제제를 투입하여 외염색체의 단백질 분해를 억제하였다. 대상자는 모두 파킨슨병에 걸리지 않았으며, 건강이 모두 양호한 상태에서 샘플을 채취하였다. 채취한 소변 샘플은 4°C의 온도에서 30분 동안 2,000 g에서 원심분리하여 세포와 세포잔해 및 박테리아, THP의 대부분을 제거하였으며 이 과정에서 샘플 사이의 무게균형을 맞추기 위해 150mM의 NaCl 식염수가 사용되었다. 세포 잔해 및 박테리아가 제거된 상등액을 80um 나일론 메시를 통과시켜 펠릿된 물질을 분리하였으며, 그 다음 4°C에서 60분간 17,000 g의 압력으로 추가 원심분리를 통해 남아있을 수 있는 매크로폴리머와 THP를 제거하였다. 여과된 용액을 0.22um 필터를 통과하여 직경이 0.22um 이상인 단백질을 제거하였다. 여과된 용액은 MWCO 멤브레인을 통해 투석 튜브에서 4°C에서 30분간 3,000 g에서 원심분리 하였다. 위 과정을 통해 정화된 소변은 ExoQuick-TC 용매를 혼합하여 4°C에서 30분간 엑소좀을 추출하였으며 추출한 혼합물은 4°C, 15,279 g에서 2분 동안 원심분리를 통해 엑소좀 펠릿을 확보하였다.

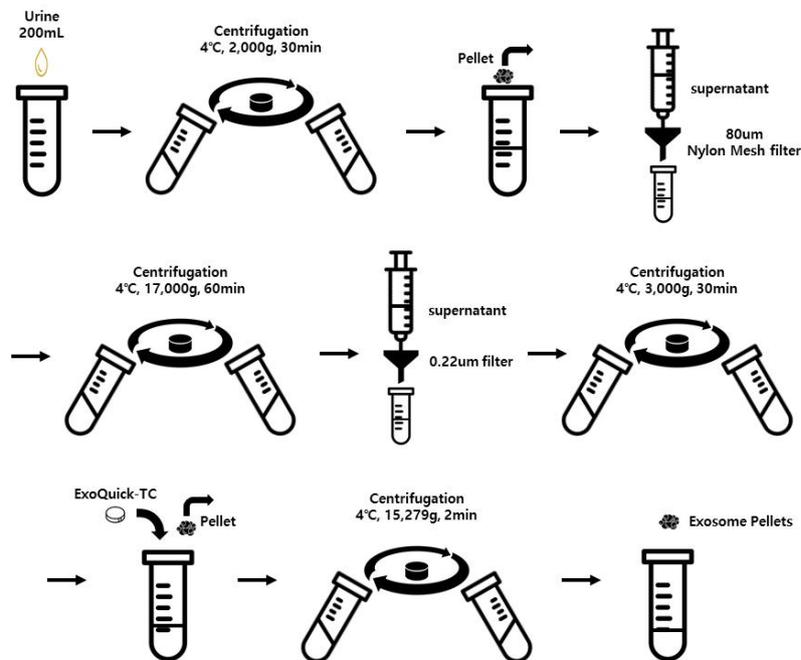


그림 23 소변을 이용한 Exosome 추출 프로토콜

## 2) 파킨슨병 감지

위와 같은 방식을 기준으로 샘플은 파킨슨 질병이 걸리지 않은 나이와 성별, 국적이 다른 8명을 대상으로 실험을 진행하였다. 측정 결과 DJ-1은 10~15ng/mL, LRRK2는 18~31ng/mL범위의 결과 값이 검출되었다. 각 항체 기준 LRRK2의 값이 가장 높게 나온 샘플은 인도출신 30대 중반 남성이며, 가장 낮은 값을 보인 인원은 20대 인도 여성이었으며, DJ-1에 경우 20대 한국 남성이 가장 높은 값을 기록하였으며, 30대 인도 남성이 가장 낮은 결과를 확인하였다.

이러한 결과를 토대로 탄소나노튜브 소재를 활용한 듀얼 항체기반 바이오센서의 파킨슨병 감지가 가능할 것으로 판단되며 향후 센서에 사용된 고정화 항체를 변경하여 타 질병 감지에도 활용 가능할 것으로 예상된다.

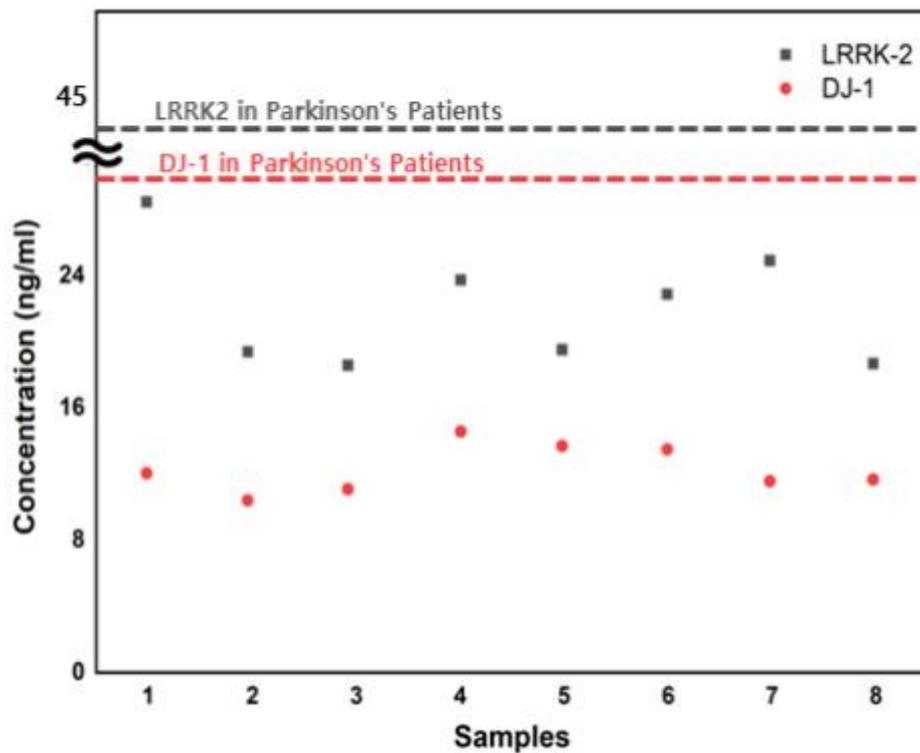


그림 24 샘플에 따른 DJ-1 및 LRRK2 측정 결과

## V. 결 론

본 연구에서는 파킨슨병 조기진단을 위하여 탄소나노튜브소재를 활용하여 효소 바이오센서를 제작하였으며, MPA, EDC, NHS, MCH 등을 사용하여 표면개질을 수행하여 센서의 성능을 향상시켰습니다. 또한, 실험 대상자의 소변에서 엑소좀을 추출하여 파킨슨병의 바이오마커인 DJ-1과 LRRK2를 검출하는 연구를 수행하였습니다. 탄소나노튜브 복합소재 바이오센서 제작 연구에서 탄소나노튜브 혼합 비율 별 면 저항 측정을 통해  $7.78\Omega/\text{sq}$ 까지 저항값을 낮추었다. 또한 노즐 사이즈와 토출 공압에 따른 선폭제어를 통해 최소 575um 최대 801um의 선폭 결과를 얻었으며, 제작 방법에 따른 면 저항과 CV 테스트를 통해 반응의 가역성을 확인하였다. 또한 표면개질을 통해 탄소나노튜브 복합소재 기반 바이오센서의 성능 향상을 입증하였습니다. 표면개질 후 각 항체에 대한 검출한계는 DJ-1에 경우 약 8.851ng이 나오며, LRRK2의 검출한계는 약 0.332ng로 도출할 수 있었다. 표면개질이 완료된 센서는 일반인을 대상으로 항체 측정을 진행하여 DJ-1은 10~15ng/mL, LRRK2는 18~31ng/mL 범위의 결과 값이 검출되었다. 이러한 데이터를 기반으로 탄소나노튜브 소재를 활용한 듀얼 항체기반 바이오센서의 파킨슨병 감지 가능성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 기반으로 듀얼 항체기반 바이오센서를 통해 기존 오랜 시간이 소요되고, 정확하지 못했던 파킨슨병 진단 연구에 새로운 접근방법으로 기여할 수 있을 것이다. 또한 DJ-1, LRRK2 항체에만 의존하는 것이 아닌 다른 항체를 활용하여 파킨슨병 외 질병 감지연구를 할 수 있을 것으로 예상된다. 본 연구는 일반인을 대상으로 엑소좀 기반 항체 검출은 원활하게 진행되었으나, 대조할만한 파킨슨병 진단 샘플 검출데이터가 존재하지 않아 실제 임상실험에서의 신뢰성을 확신할 수 없다. 연구 결과의 신뢰성을 향상시키기 위해서는 파킨슨병에 걸린 환자를 대상으로 엑소좀 추출 및 검증 실험을 진행하여 대조군을 확보해야 한다.

## 참고 문헌

- [1] 김중석. "파킨슨병의 조기진단과 치료." *임상노인의학회지* 10.3 (2009): 291-301.
- [2] Dolgacheva, Ludmila P., et al. "Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 51 (2019): 175-188.
- [3] Kim, Hyejung, et al. "Methionyl-tRNA-synthetase is a Novel Interacting Protein of LRRK2." *Journal of Life Science* 28.2 (2018): 170-175.
- [4] 윤서연. "생활방식 인자가 파킨슨병에 미치는 영향." *대한노인재활의학회지* 11.1 (2021): 31-36.
- [5] Karaboğa, Münteha Nur Sonuç, and Mustafa Kemal Sezgintürk. "Biosensor approaches on the diagnosis of neurodegenerative diseases: Sensing the past to the future." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 209 (2022): 114479.
- [6] Mobed, Ahmad, et al. "Biosensors in Parkinson's disease." *Clinica Chimica Acta* 518 (2021): 51-58.
- [7] Guo, Zhipan, et al. "Constructing a novel 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine electrochemical sensor and application in evaluating the oxidative damages of DNA and guanine." *Biosensors and Bioelectronics* 86 (2016): 671-676.
- [8] De Volder, Michael FL, et al. "Carbon nanotubes: present and future

commercial applications." science 339.6119 (2013): 535-539.

[9] Perumal, Veeradasan, and Uda Hashim. "Advances in biosensors: Principle, architecture and applications." Journal of applied biomedicine 12.1 (2014): 1-15.

[10] 구수진. "바이오센서로서 표면 플라즈몬 공명." BT NEWS 11.2 (2004): 24-34.

[11] Rocchitta, Gaia, et al. "Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids." Sensors 16.6 (2016): 780.

[12] Nguyen, Hoang Hiep, et al. "Immobilized enzymes in biosensor applications." Materials 12.1 (2019): 121.

[13] Zhang, S., G. Wright, and Y. Yang. "Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction." Biosensors and Bioelectronics 15.5-6 (2000): 273-282.

[14] Sireesha, Merum, et al. "A review on carbon nanotubes in biosensor devices and their applications in medicine." Nanocomposites 4.2 (2018): 36-57.

[15] De Volder, Michael FL, et al. "Carbon nanotubes: present and future commercial applications." science 339.6119 (2013): 535-539.

[16] Smart, S. K., et al. "The biocompatibility of carbon nanotubes." Carbon 44.6 (2006): 1034-1047.

[17] 이도연, 허요섭, and 김근환. "파킨슨병 치료제 연구분야의 기술 동향 분석

및 기술 융합 현황: 글로벌 특허 정보를 중심으로." 한국융합학회논문지 11.3 (2020): 135-143.

[18] 윤희진. "Wav2vec 을 이용한 오디오 음성 기반의 파킨슨병 진단." 디지털융복합연구 19.12 (2021): 353-358.

[19] 설원기. "가족성 파킨슨병의 원인 유전자." 대한정신약물학회지 19.1 (2008): 29-37.

[20] Kim, Hyejung, et al. "Methionyl-tRNA-synthetase is a Novel Interacting Protein of LRRK2." Journal of Life Science 28.2 (2018): 170-175.

[21] Balestrino, Roberta, and A. H. V. Schapira. "Parkinson disease." European journal of neurology 27.1 (2020): 27-42.

[22] 강지운. "나노바이오 센서/칩의 연구동향." 전기전자재료 17.4 (2004).

[23] Khoshnevisan, B., M. Behpour, and D. Kaveh. "Optimization of hydrogen uptake in Ag - CNTs electrodes with charge - discharge cyclic currents." Physica B: Condensed Matter 404.12-13 (2009): 1733-1736.

[24] Shinwari, M. Waleed, et al. "Microfabricated reference electrodes and their biosensing applications." Sensors 10.3 (2010): 1679-1715.

[25] He, Xinyang, et al. "PEDOT: PSS/CNT composites based ultra-stretchable thermoelectrics and their application as strain sensors." Composites Communications 27 (2021): 100822.

[26] Shen, Jie, and Chung-Chiun Liu. "Development of a screen-printed

cholesterol biosensor: Comparing the performance of gold and platinum as the working electrode material and fabrication using a self-assembly approach." *Sensors and Actuators B: Chemical* 120.2 (2007): 417-425.

[27] Keleştemur, Seda, Mine Altunbek, and Mustafa Culha. "Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins." *Applied Surface Science* 403 (2017): 455-463.

[28] Vashist, Sandeep Kumar. "Comparison of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide based strategies to crosslink antibodies on amine-functionalized platforms for immunodiagnostic applications." *Diagnostics* 2.3 (2012): 23-33.

[29] Sun, Xiulan, et al. "Enzymatic amplification detection of peanut allergen Ara h1 using a stem-loop DNA biosensor modified with a chitosan-mutiwalled carbon nanotube nanocomposite and spongy gold film." *Talanta* 131 (2015): 521-527.

[30] Perumal, Veeradasan, and Uda Hashim. "Advances in biosensors: Principle, architecture and applications." *Journal of applied biomedicine* 12.1 (2014): 1-15.

[31] Kalluri, Raghu, and Valerie S. LeBleu. "The biology, function, and biomedical applications of exosomes." *Science* 367.6478 (2020): eaau6977.

[32] Jang, Jihoon, et al. "Oxidized DJ-1 levels in urine samples as a putative biomarker for Parkinson's disease." *Parkinson's Disease* 2018 (2018).

[33] Taymans, Jean-Marc, et al. "LRRK2 detection in human biofluids: potential use as a Parkinson's disease biomarker?." *Biochemical Society Transactions* 45.1 (2017): 207-212.

# Development of Dual Antibody-Based Biosensor Using Carbon Nanotube Materials

In Seok Kang

Department of Mechatronics Engineering  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

Parkinson's disease is an important senile disease recognized worldwide and is attracting attention due to the rapid increase in its incidence. In this context, this study explored the possibility of early diagnosis of Parkinson's disease by developing biosensors using carbon nanotube (CNT) composites. In this study, we developed a dual antibody-based biosensor targeting the Parkinson's disease gene mutations, DJ-1 and LRRK2. This focused on maximizing the sensor's performance by leveraging the outstanding electrical properties of the CNT. In the experiment, the mixing ratio of various CNT composite materials was tested, and through this, the cotton resistance was successfully lowered to 7.78 ohm/sq. This played an important role in improving the performance of sensors and in the accurate detection of Parkinson's disease biomarkers. In addition, this study sought to improve the performance of sensors through sensor surface modification. This method has succeeded in increasing the accuracy and stability of the

sensor. As a result of this study, in antibody measurements conducted in the general population, results in the range of 10-15 ng/mL for DJ-1 and 18-31 ng/mL for LRRK2 were obtained. This shows that carbon nanotube-based biosensors can be used as an effective tool for early diagnosis of Parkinson's disease. Therefore, this study proved that the development of biosensors using CNT materials can play an important role in early diagnosis of senile diseases such as Parkinson's disease. This suggests the possibility of being used for the diagnosis of Parkinson's disease and other diseases, and will contribute to the development of more accurate and faster disease diagnosis methods.