

## 면역센서의 원리와 의학적 응용

†김 의 락 · <sup>1</sup>백 세 환  
계명대학교 자연과학부 화학과, <sup>1</sup>고려대학교 생명정보공학과  
(접수 : 2002. 3. 28., 게재승인 : 2002. 4. 25.)

## The Principles and Medical Applications of Immunosensors

Ui Rak Kim† and Se-Hwan Paek<sup>1</sup>

Department of Chemistry, Keimyung University, 1000-Shyndang-Dong, Daishyu-Ku, Daegu 704-701, Korea  
<sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University 1.5-Ka, Anam-Dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea  
(Received : 2002. 3. 28., Accepted : 2002. 4. 25.)

Immunosensors are of great interest because of their potential utility as specific, simple, label-free, direct detection means and provision of reduction in size, cost and time of analysis comparing with conventional immunoassay. In the last two decades, many reports have been published on the use of immunosensors for a wide range of applications to clinical diagnostics, pharmaceutical chemistry, environmental monitoring, biotechnology and food industries. There are also numerous transduction techniques developed such as electrochemical techniques, piezoelectric crystal, and surface plasmon resonance receiving much attention for the direct monitoring of immune reactions at solid surfaces. In this article, the principles, characteristics, structures, functions and clinical applications of immunosensors were reviewed

**Key Words** : immunosensor, clinical diagnostics, alternative immunoassay systems, transducers, IAsys, SPR(surface plasmon resonance), optical chip

### 서 론

면역분석기술(immunoassay techniques)은 항원 또는 항체(antibody)가 대응되는 면역종(immunosppecies)과 복합체를 형성하는 면역상호작용(immuno interaction)을 측정 원리의 기초로 한다.

대부분 면역분석기술은 면역종(immunosppecies)중 하나를 고체 운반체(solid carrier)에 고정화(immobilization)한 후, 측정하려는 분석물질이 포함된 용액과 작용 시켰을 때, Figure 1 과 같이 열쇠와 자물쇠 원리로 특이면역상호작용에 의하여 고체 운반체(solid carrier) 표면에 항원-항체 복합체가 형성된다(1). 그러므로 시료 중에서 비결합(free)과 결합(bound)으로 물질의 상 분리(phase separation)가 일어나고, 세척(washing)이 되므로 측정하려고 하는 물질의 검출이 가능하게 된다.

결합 면역체의 정량은 측정에 적당한 특이 성질을 가진 면역종에 표지물질(label)을 공유결합으로 결합시켜, 표지물질의 양을 측정하여, 측정하려고 하는 면역체의 양을 구하는 방법과 비표지 직접 측정법이 있다.

표지물질로는 방사성 동위원소를 처음 사용하였고, 아직까지도 많은 분석에서 사용하고 있다(2). 그리고 형광물질(fluorecent)(3), 인광물질(luminescent)(4), 광산란(light scattering)(5), 그리고 효소를 이용한 표지법(6)의 출현으로 면역분석법의 적용 범위는 폭발적으로 증가하였다(7,8).

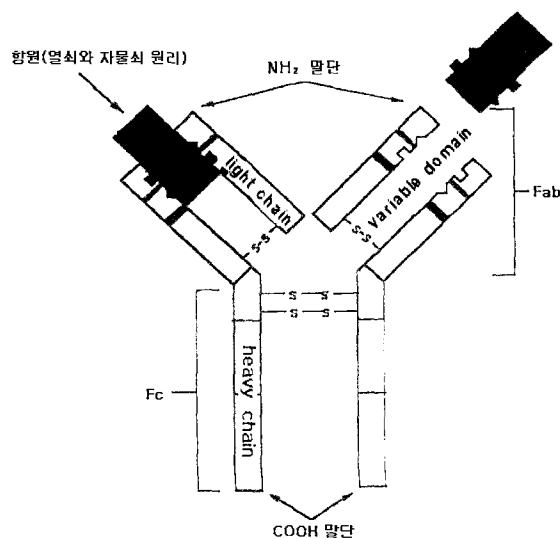


Figure 1. 면역 글로빈(immunoglobulin G, IgG)의 구조와 항원-항체 결합 특이성(열쇠와 자물쇠 원리)(1).

†Corresponding Author : Department of Chemistry, Keimyung University, 1000-Shyndang-Dong, Daishyu-Ku, Daegu 704-701, Korea  
Tel : +82-53-580-5181, Fax : +82-53-580-5164  
E-mail : kur@kmu.ac.kr

임상분석에서 사용되는 효소면역분석의 가장 보편적인 방법은 효소가 결합된 면역흡착분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이다.

특히 많이 쓰이는 방법은 "Sandwich"법과 경쟁적 결합 면역분석법(competitive binding immunoassay method)이다(9). "Sandwich 분석법"은 작은 분자량을 가진 haptens의 측정에는 사용할 수 없는 단점이 있고, 경쟁적 결합 면역분석법은 분자 크기가 큰 항원분자의 분석에 사용할 수 있지만 역농도의존성(inverse concentration dependence)과 낮은 감도를 가지는 단점이 있다. 일반적으로 임상 검사실에서의 면역분석은 많은 수(때로는 동일한)의 검체를 일정한 방법으로 연속 측정되어진다. 이때 사용되어지는 면역분석은 미량 적정법(microtitration)에 의해 이루어지는데, 측정시간이 길고(여러 시간) 힘이 많이 든다(10,11). 그러나 현재 대부분의 면역분석이 96-구멍 미량 적정기(96-well microtiter)로 많은 검체를 동시에 측정한다. 그러나 이 방법은 감도는 높지만 자동화가 어려운 단점이 있고(12), 장비가 갖추어진 검사실과 기술적으로 훈련을 받은 사람이 있어야만 가능하다.

다시 말하면 일반 임상 검사실에서 사용되는 면역 분석 기술의 한계성을 주는 요인을 기술하면

- 면역 분석이 여러 단계를 거쳐 진행되며, 분석이 일 반적으로 복잡하고, 고도로 훈련된 기술자가 있어야 한다.
- 면역 분석에 사용되는 장비들은 소형화(miniature)할 수 없고, 가격이 고가이다.
- 여러 단계의 측정과정은 자동화하기가 어렵다.
- 이 방법들은 검사실 외에는 측정할 수 없다.
- 측정시간이 장시간 걸리므로(여러 시간) 응급 환자를 위한 검사는 불가능하다.
- 방사능을 이용할 때 취급 자격증을 가져야 하고, 측정기기가 고가 품이다.
- 방사능 물질을 사용하였을 경우 폐기물 처리가 어렵다.

그러나 혈액 등 체액 중에는 건강상태나 환자의 종류에 따라 각종 물질들이 극 미량 함유되어 있으므로 이들 물질들의 정밀한 측정은 건강진단과 진료에 중요한 정보를 제공한다. 1950년 후반과 1960년 초부터 항체(antibody)를 이용하여 항원(antigen)의 양을 정량 한 이래(13) 지금까지 면역 분석법은 미량의 생체 물질 측정에 가장 유용한 방법으로 알려졌다. 그 후 측정할 수 있는 농도범위를 넓히고, 다양한 종류의 생체 기질에 적용시키고, 또 측정 방법의 종류를 확대하고 다양하게 하기 위한 연구가 계속되고 있다.

또 지난 몇 년간은 전형적 면역 측정법이 아닌 변형적 측정방법을 연구한 논문들이 많이 발표되었다. 이러한 연구의 목적은 측정시간을 단축시키고, 감도를 증가시키며, 측정과정을 자동화하는 등 지금까지의 측정법을 개선하는데 있다. 또 면역 분석법은 주로 임상검사나 진단용으로 사용되어 왔으나, 환경관리나 식품품질관리 같은 다른 분야에도 응용되고 있다(14).

본 논문에서는 최근 면역센서의 원리와 변형된 면역 측정법 및 의학적 응용에 대하여 논하고자 한다.

#### 변형적 면역분석 측정법(Alternative immunoassay systems)

변형된 면역분석 측정법(alternative immunoassay systems)

의 기본 원리는 전형적 면역 분석법(conventional immunoassay systems)과 같이 항원-항체 상호작용(antigen-antibody interaction)의 검출을 기초로 하고 있다. 변형된 면역기술 개발의 목표는 면역 상호작용의 효율을 증가시키고, 검출방법의 감도를 높이고, 짧은 시간 내에 측정이 가능하며, 자동화하고, 소형화되며, 다 기능화 또는 시스템(system)화 하는데 있다. 이들 두 면역 분석법간의 구분을 지우는 것은 어렵지만, 면역센서(immunosensor)를 이용하는 측정법이 전형적 면역분석 측정기술에 대한 변형적 면역분석 기술법이 된다. 왜냐면 면역센서(immunosensor)는 자동화 할 수 있고, 분리 정제하지 않고, 직접측정이 가능하며, 측정속도가 빠르며, 요구에 따라 자료를 얻을 수 있고, 경우에 따라 소형화 할 수 있기 때문이다.

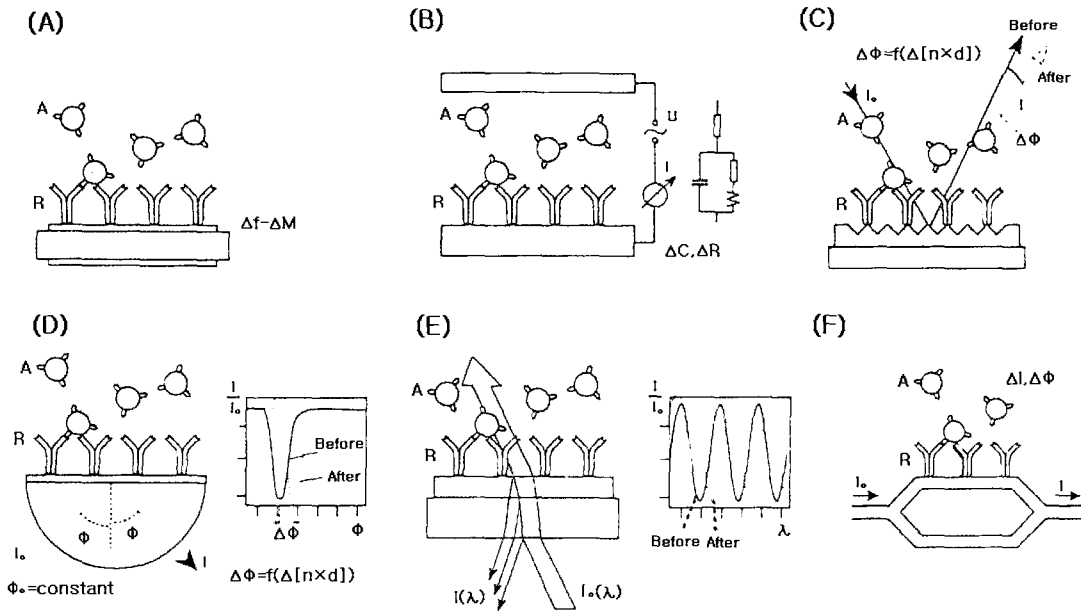
바이오 센서(biosensor)는 효소 바이오 센서, 조직 바이오 센서, 오르가넬라 바이오 센서, 효소와 조직을 동시에 사용한 혼합형 센서 등과 같은 biocatalytic biosensor 그리고 면역 바이오 센서, receptor 바이오 센서, DNA 바이오 센서와 같은 bioaffinity biosensor로 나눌 수 있다(15). 이 중 면역센서(immunosensor)는 항원(antigen)과 항체(antibody)가 특이적으로 복합체를 형성하는 면역 화학 반응(immunochemical reaction)을 이용하여 극 미량의 어떠한 물질도 쉽게 측정할 수 있다. 왜냐하면 생체는 거의 무한대 가지수의 항원에 대하여 각각 대응하는 특이 항체를 만들어 낼 수가 있기 때문이다. 이러한 현상은 생명체의 가장 신비한 능력 중 하나이다. 이때 체내에 들어온 이물질(foreign material)은 간염 virus 같은 것도 있고, 병원성 세균과 같은 박테리아도 있어서 여러 가지 몹쓸 병을 유발하기도 한다.

혈액 등 체액 중에는 건강 상태나 환자의 종류에 따라 각종 물질들이 극 미량 함유되어 있으므로 이들 물질들의 정밀한 측정은 건강진단과 진료에 중요한 정보를 제공한다.

면역센서(immunosensor)는 바이오 센서(biosensor)의 일종이므로 항원 또는 항체를 선택적으로 식별하고, 반응특이성을 장시간 유지 보존하기 위하여 고체 운반체(solid carrier)에 항원 또는 항체를 고정화(immobilization)하여 기능성 막을 만들고, 이 막을 통하여 항원 또는 항체를 인식하여, 항원-항체 복합체를 형성시켜 그 양을 여러 가지 변환기(transducer)를 통하여 전기 신호로 변환시키는 부분으로 구성되어 있다. 전형적인 고체상 면역분석법(conventional solid-phase immunoassay)과 면역센서(immunosensor)는 차이가 있다.

즉 전자는 일반적으로 관계되는 약품을 한번(비록 적은 양이기는 하지만) 사용하지만 면역센서(immunosensor)는 항원-항체 복합체 형성의 역반응(reversibility)을 이용하여 고정화 성분의 재생(regeneration)을 쉽게 할 수 있으므로 반복하여 사용할 수 있다. 그러나 특히 높은 친화성 상수(affinity constant)와 변화를 일으키기 쉬운 고정화 물질일 경우에는 기능면을 재생하기가 어렵다. 면역센서의 감도와 선택성은 다른 고체상 면역분석법과 같은 특성에 의하여 결정된다. 다시 말하면 결합물질(binding agent)의 친화성(affinity)과 특이성(specificity) 그리고 측정기의 잡음(background noise of the detection system) 등과 같은 요인에 의하여 영향을 받는다.

면역센서는 크게 둘로 나눌 수 있다. 그 중의 하나인 간접 측정 면역센서(indirect immunosensor)는 감도를 증가시키기



**Figure 2.** 비표지 항원-항체를 이용한 직접측정 면역센서의 종류(16) A)질량 변화측정형(예. 수정결정 미량저울에 의하여)  $\Delta M$ :질량 변화량  $\Delta f$ : 진동수 변화량 B)전기화학적 임피던스(impedence)또는 관계되는 전기화학적 성질 측정형 (전류(I)와 전압(V)의 측정에 의한)  $\Delta C$ :커패시턴스(capacitance)의 변화량  $\Delta R$ :저항의 변화량 등등 C)회절발 커플러(grating couplers)형  $I_0$ :측정하려고 하는 비표지 생체분자와 작용하기 전의 입사광(화살표쪽)으로 I:상호작용 상(phase)변화후의 반사광  $\Delta \phi$ :광학적 두께(optical thickness)의 변화량 측정(주 굴절률 n과 막두께 d)  $\Delta \phi=f(\Delta [n \times d])$  D)표면 플라즈몬 공명형(surface plasmon resonance) 입사광과 반사광의 변화량 측정  $\Delta \phi=f(\Delta [n \times d])$  오른쪽 그래프는 반응전·후의 측정커브(curves) E)반사계 간섭형(reflectometric interference) 파장의 강도 변화량 측정, 오른쪽 그래프는 반응전·후의 측정커브(curves) F)Mach-Zehnder 간섭계(Mach-Zehnder interferometer)  $\Delta I$ :강도 변화량  $\Delta \phi$ : 상 변화량 A:측정할 물질 R:고정화된 인식단위(recognition units).

위하여 면역종 중 하나를 형광(fluorescence), 인광(luminescence)이나 효소로 결합시킨 후 면역반응 후 생성된 분리된 표지 측정 물질을 사용하여 그 양을 검출하는 불균일 면역 분석법(heterogenous immunoassay)이다. 다른 하나인 직접 측정 면역센서(direct immunosensor)는 전위차 차이, 전류나 저항의 세기, 질량, 열 또는 광학적 성질의 변화량에 의하여 항원-항체 복합체 양을 측정하는 균일 면역 분석법(homogeneous immunoassay)이다.

비록 간접 측정 면역센서는 비특이성 결합물의 영향 등 몇 가지 문제점이 있고, 직접측정 면역센서는 항원-항체 반응을 실시간 관찰(in real time monitoring)할 수 있고, 표지 물질을 사용하지 않거나, 하지 않던가 하여 측정 범위가  $10^{-9} \sim 10^{-13}$  mol/L까지 넓게 적용되지만, 상품화된 것은 주로 광학적 면역센서이다.

면역센서는 Figure 2와 같이 변환기의 차이에 따라 광, 질량 그리고 전기 화학적 면역센서(optical, gravimetric and electrochemical immunosensor)로 구분된다(16).

표지 광면역 센서는 광에 민감한 물질로 항원 혹은 항체를 표지하여, 분광 광도법(spectrophotometry), 분광 형광법(spectrofluorimetry), 화학 발광법(chemiluminometry) 그리고 광 반사법(reflectometry)에 의하여 측정하고 비 표지 광면역 센서의 경우에는 광 변환기에서 생성되는 진폭(amplitude), 상(phase), 진동수(frequency) 그리고 편광화(polarization)와 같은 광의 기본 성질 중 하나 또는 그 이상의 변화량을 측정하여 검지 물질의 양을 정량한다.

면역센서가 갖추어야 할 요건은 일반적으로 바이오 센서와 같이 감도(sensitivity)가 높고, 선택성(selectivity)이 좋고, 안정

도(stability)가 커야 하는 3S와 복귀도(reversibility), 신뢰도(reliability), 재현성(reproducibility)이 좋은 3R이 요구되며, 그 외 부대 요건으로서는 사용의 간편성, 기능성, 적응성, 규격성, 보존성, 정확성이 좋아야 한다. 현재 연구되고 있는 면역센서 기술 개발의 동향은 모두가 이러한 요건을 증가시키고, 만족시키기 위하여, 생 활성면의 장시간 유지, 보존과 변환기의 종류와 기능을 개선하여 실험실과 검사실에서만 이루어지던 면역분석기술을 병실 환자 침대에서 이루어질 수 있도록 개선하고, 개발하는데 집중되어 있다.

**화학적 면역센서(Electrochemical immunosensor)**

전기 화학적 변환기는 면역상호작용에 의하여 생긴 전자 이동변화를 측정하는데 전위차법(potentiometric), 전류법(ampereometric), 일정한 전압하에서의 전도도법(conductometric) 또는 전압 변화 하에서의 임피던스 법(impedimetric)이 있다.

**전위차 변환기(Potentiometric transducers)**

전위차 변환기(potentiometric transducers)는 감지막(sensing membrane)에 이온(ion)의 선택적 결합의 결과로 막 전위(membrane potential) 축적(accumulation)으로 전위차 변화를 측정한다. 이 방법은 비특이성 물질의 결합에 의하여 감도가 낮게 나타나고, 그 후 크게 흥미를 가지지 못하였다. 그 후, Rechnitz와 그의 공동 연구자들은 센서 표면에 검지 물질속에 포함된 이온의 결합으로 센서 표면과 측정물질간에 전하 분리(charge separation)를 일으켜 기준 전극(reference electrode)에 대한 전위차를 측정하는 이온 선택성 전극(ion-selective

elec- trode, ISE)과 pH-전극 또는 기체 감지전극을 전위차 면역센서에 결합시켜 감도를 증가 시켰다.

그 예로서 이산화탄소 기체 감지전극을 이용하여 항생물질(antibiotics)의 면역화학적 측정을 하였고(17), 사람 IgG(18) 그리고 digoxin(19)을 측정하였다. ISE를 이용한 면역센서로써는 prostaglandins(20), cortisol(21) 그리고 여러 가지 다른 항원-항체 측정에 이용하였다(22).

항체 감지 면역센서(antibody-sensitive immunosensors)는 고정화된 항원에 항체가 선택적으로 결합되었을 때 이온운반성질(ionophoric properties)의 변화에 의하여 생긴 전위차를 측정한다(23). 또 막에 단산 항체(monoclonal antibody)를 고정화하여 항원을 측정하였다(24). 1970년 field effect transistor (FET) 기술이 수소 이온 감지 pH 센서로 사용하기 위하여 처음으로 소개된 후 FET 기술을 이용한 전위차 감지에 대한 관심이 크게 증가하였다(25).

왜냐하면 FET 디바이스(device)를 사용하면 크기가 소형이고, 측정하려고 하는 물질은 적은 양 필요하고, 의학적으로 체내에 삽입하기가 좋고, 크기가 적기 때문에 여러 종류의 FET 센서를 결합시켜 여러 가지 물질을 동시에 측정할 수 있는 다 기능성 센서(multiple sensor)의 제작이 가능하기 때문이다.

FET를 ISE의 이온 선택성 막과 결합시켜 더 발전된 이온 선택성 FET(ISFET)를 만들었으며, 면역센서에서의 응용으로는 항원-항체 복합체 형성이 일어나는 등전점 (isoelectric point) 이나 전하밀도의 변화를 측정하는데 이용되었다(26). 전기 촉매 활성 생 촉매 물질(electrocatalytically active biocatalyst)을 표지로 사용하는 전위차 면역센서가 발표되었다(27). 그 예로 인슐린(insulin) 측정을 위하여 lacetase를 항 인슐린 항체에 표지하여 사용하였다. 또 비생체 물질인 금속 이온을 표지물질로 사용한 후막형(thick film) 전기 화학적 면역센서의 연구 결과도 있다(80-82).

그러나 전위차 면역센서는 여러 가지 문제점이 있다. 즉 모든 생체 물질의 전하밀도(charge density)가 이온(ion)과 같은 바탕 방해물(background interferences)에 비하여 작기 때문에 신호 대 잡음 비(signal to noise)가 낮다. 그리고 응답 신호가 pH나 이온세기(ion strength)와 같은 조건에 크게 영향을 받는다(28).

이온 선택성 전위 변환기가 가지는 큰 문제 중의 하나는 측정된 전위가 단지 이온의 활동도에 관계된다. 비록  $10^{-4}$ 농도까지는 활동도가 농도에 비례하지만 이 값 이상에서 활동도가 점차적으로 줄어든다. ISE들은 다른 이온에 의하여 방해받기 쉬우므로 센서의 특이성이 줄어든다. 비록 FET를 이용한 디바이스(device)가 개선된 전위차 측정법이지만 디바이스(device)에 미지물질(unknown species)의 흡착이나 오염에 의하여 신뢰성 (reliability)이 적고, 감도와 재현성 그리고 선택성이 낮고, 다른 전기 화학적 센서에 비하여 비싸고, 제작이 어려운 단점이 있다. 비록 전위차 감지기술이 면역화학 반응의 검출에 응용될 수 있지만 항상 높은 감도와 특이성을 가진다고 할 수 없는 것이 단점이다.

#### 전류 측정 변환기(Amperometric transducers)

전류 변환기를 이용한 바이오센서는 크게 개발되었고, 현

재 상품화되고도 있다(29). 이 디바이스(device)는 일정한 전압하에서 전기화학전지(cell)를 통하여 전류흐름을 측정하는 장치이다. 이 전류는 감지 전극에서 측정하려는 물질의 산화-환원반응에 의하여 생성되고, 전극 표면에서 측정하려는 물질의 농도에 직접 비례한다(30). 면역화학 반응을 전류법에 의한 검출은 효소로 표지하는 ELISA 법으로 1979년 사람의 융모성 성선자극 호르몬(human chorionic gonadotropin, hCG)을 측정한 것이 처음이다(31). 그 외 alkaline phosphatase로 표지하여 Factor VIII 관련 항원(32),  $\alpha_1$ -acid glycoprotein(33) 혈청속에 apolipoprotein E(34), 사람의 생식선 자극 호르몬들(human gonadotropin hormones), 난포 자극 호르몬(follicle stimulating hormone), 항체 형성 호르몬(luteinizing hormone) (35), 그리고 다른 혈청 항원(36)측정에 이용되는 등 많은 논문이 보고되고 있다(37-42). 전류측정 면역센서로 면역글로블린(immunoglobuline)측정을 위한 표지물질로서는 *o*-aminophenol과 그 유도체 그리고, polyaniline이 널리 사용되어진다(43). 전류측정 면역센서가 다른 전기화학 측정법 보다 더 유망한 결과를 도출하고 있고, 미소조립(microfabrication)으로 비표지 전류측정 면역센서의 상품화 가능성이 크다.

#### 전도도 측정 변환기(Conductometric transducers)

여러 가지 화학반응에서 이온종을 생성하기도 하고, 소모하기도 하며, 용액내에서 전체 전기 전도도가 화학반응에 따라 변화를 일으키므로, 전도도 측정법은 화학분야에 널리 응용되어진다. 전기 전도도성 고체 지지대(전도도성 고분자 물질들)와 ELISA로 구성된 전도도성 면역센서가 살충제 검출을 위하여 연구되었다(44). 과거에는 측정하려는 시료의 이온 강도(ionic strength)와 완충력(buffer capacity)의 변화 등 많은 문제를 야기하였지만 최근에는 이러한 점을 극복하였다. 또 전도도 측정센서는 용액의 저항이, 존재하는 모든 이온들의 이동에 의하여 측정되어지므로, 비특이성 때문에 측정값의 신뢰도가 떨어지는 것이 문제이다. 전도도성을 이용한 면역센서의 연구 결과가 많이 발표되고 있다(45-47).

#### 임피던스 변환기법(Impedimetric transducers)

여러 가지 전기화학적 변환기 중에서 임피던스 변환기법은 변형시킨 전극계면(modified electrode interface)의 성질을 조사하는 유용한 방법이다. 그리고 전도성 지지대(conductive supports)와 결합시켜 화학반응의 전환과정을 이해하는 데 사용되어진다. 전극계면에서의 전하이동현상은 전극표면의 성질과 전기 이중 층(electrical double layer)의 구조에 의하여 크게 영향을 받는다. 전도성 지지대위에 절연성 물질(insulating materials)의 흡착(adsorption)또는 탈착(desorption)은 전극 표면에서 계면 전자 이동현상(전기 용량 그리고 저항)을 변화시킨다. 이러한 원리를 이용한 임피던스 변환기를 면역센서에 응용한 연구논문이 발표되고 있다(48-52).

산화-환원 쌍 존재하에서 전하이동이 관찰되고, Faradic 임피던스가 측정되어진다. 전극이 막음층(blocking layer)으로 도포(coating)하였기 때문에 항원-항체 복합체 형성은 전기화학적 임피던스를 변화시킨다. 항원이 전극표면에 고정화한 항체에 결합할 때 산화-환원 쌍의 작용이 항원이 없을 때 보다 더 크게 방해 받는다. 산화-환원 쌍의 Faradic 반응이 크게

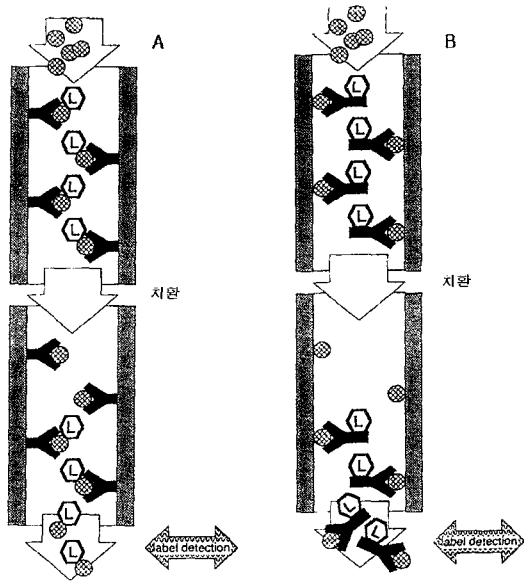


Figure 3. 치환(displacement) 흐름 주입 면역분석법의 원리(56). A. 표지된 항원으로 B. 표지된 항체로.

방해받으므로 전하이동 저항(resistance)이 커질 것이고, 전기 용량(capacitance)이 감소하게 된다. 그러나 항체를 고정화한 전극표면에 항원의 결합 반응이 종종 임피던스 측정을 할 만큼 큰 신호변화를 생성하지 않는 경우가 있다(49,53). 이러한 단점을 극복하기 위하여 임피던스 측정을 위한 증폭법이 발표되었다(54).

**면역 컬럼(Immuncolumns): 흐름 주입 면역분석(Flow-injection immunoassay)**

전형적인 고체상 면역분석에서는 측정하려고 하는 면역종을 포함한 액체의 체적에 대한 면역상호작용이 일어나는 표면적의 비가 아주 낮다. 측정하려고 하는 면역종을 포함한 액체로부터 면역상호작용 표면에 면역종이 확산에 의하여 일어나므로 제한된 반응속도를 가진다. 그러므로 전형적인 고체상 면역분석 측정은 일반적으로 장시간 소요된다.

흐름 주입 분석법(flow injection assay)은 액체상에 대한 고체상의 체적에 대한 면적비가 높기 때문에 면역상호작용의 효율을 증가시켜 반응시간을 빠르게 진행시켜, 총 분석시간을 10~20분으로 단축 시켰다(55).

이 분석법은 Figure 3과 같이 column에 항원 또는 항체를 고정화한 후 표지항체 또는 항원으로 포화시켜 항원-표지항체 또는 항체-표지항원 복합체를 형성시킨 후 비표지 항체(free antibody)나 비표지 항원(free antigen)을 column에 주입하면 일반적으로 표지 항원 또는 항체는 비표지 항원 또는 항체보다 입체적 효과로 친화도가 낮기 때문에 치환이 일어난다.

그 결과 column으로부터 흘러나온 표지 항원 또는 표지 항체를 측정하여, 측정하려는 항체 또는 항원의 양을 측정할 수가 있다. 그 결과 형광을 표지한 흐름 주입 면역센서를 이용하여 cocaine (56), atrazine(57,58) 그리고 insuline(59)을 100 nM ~ 10 nM의 낮은 농도 한계로 측정하였다. 흐름 주입 분석법은 단일과정(simple stage procedure)이므로 마이크로 프로세서(microprocessor)로 조절되는 정밀한 펌프(precision pumps)

와 시료 수집기(samplers)를 이용하여 좀더 쉽게 자동화할 수 있다(55).

전형적 면역분석법(경쟁적 결합 그리고 sandwich 법)에 흐름 주입 면역분석법을 이용할 수 있다. 이 경우에 문제는 column의 재생이 어렵고, 표지된 면역종으로 면역흡착반응은 column의 성질을 변형시키며, 경우에 따라서 column 재생과정이 필요할 때도 있다.

이러한 문제점을 극복하고, theophylline 측정을 위하여 Protein A로 고정화한 column을 사용한 방법을 발표하였다(60). 이 Protein A는 높은 친화도로 대부분의 면역글로빈(immunoglobulins, 항체)과 결합하는 성질을 갖고 있다. 분석이 끝난 후 column을 산(acid)으로 용출시켜 항원-항체 복합체를 제거하면 column을 재생시킬 수 있고 고정화된 Protein A는 다시 새로운 항체로 포화시켜 분석을 다시 계속 할 수가 있다.

Protein A는 면역 column 재생법(immuno-column regeneration)의 여러 가지 효소표지 전기 화학적 시스템(60)과 형광 표지 광학적 검출 면역분석(61)에 응용되었다. Sandwich 분석법에서 낮은 pH에 의한 column 재생은 항원-항체 복합체의 해리를 일으킨다.

Pollema와 Ruzicha는 흐름 주입 분석법에서 면역 column 재생에 따른 문제를 일회용 면역 column(disposable immuno-column)의 개발로 해결하였다(62). 흐름 주입 분석법의 장점과 일회성을 결합하여 digoxin 측정을 위한 면역센서에 대하여 발표하였다. 이 경우에 마이크로 column으로 20 μL의 체적을 가진 유리 모세관을 사용하였다.

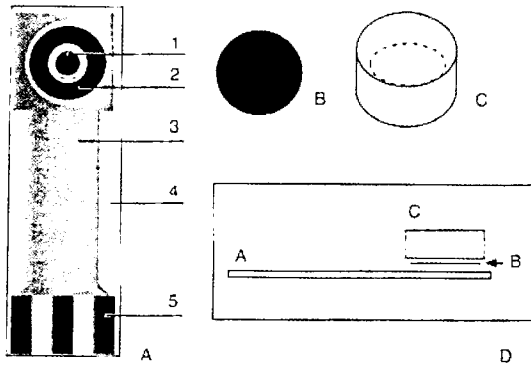
이는 모세관의 체적에 대한 면적의 비가 충분히 크기 때문에 항원-항체 결합에 확산효과를 줄이고, 면역상호작용을 빠르게 하는 흐름 주입 column과 같은 효과를 나타낸다. 이때 10 pM의 낮은 검출관계를 가지고, 분석을 위하여 시료 20 μL의 마이크로 프로브(microprobe)를 사용할 수 있다. 또 큰 표면적을 가진 탄소를 고정화 항체의 운반체로 사용하여 탄소 재질 위에 면역흡착제를 고정화한 일회용 column에 대하여 발표하였다(63). 이때 체적에 대한 면적의 비가 높기 때문에 면역종간 상호작용의 효율과 감도를 증가시킬 수 있다. 또 사용되는 탄소입자의 크기를 단백질 분자의 크기와 유사하도록 하므로 비결합 면역종과 고정화 면역종(immunocomponents) 사이에 준 균일화 면역상호작용(pseudo-homogeneous immunointeraction)의 효과를 나타낸다(64).

흐름 주입 면역분석으로 과산화 수소 그리고 alkaline phosphatase 같은 효소 표지 면역종의 전기 화학적 측정을 하였다(65). 특히 형광과 인광으로 면역종을 표지하여 널리 사용하였다(56,59,61).

흐름 주입 면역분석은 면역감지 시스템의 높은 특이성과 액체 크로마토그래피의 이점(높은 자동화된 빠른 분석)을 결합시킨 것으로 어느 의미에서 흐름주입 면역분석 기술은 친화 크로마토그래피(affinity chromatography)의 변형이라 생각할 수 있다.

**효소 표지의 전기화학적 검출 면역센서**

표지된 면역종의 전기화학적 측정은 광학적 방법과 비교할 때 몇 가지 이점이 있다.



**Figure 4.** 줄 면역센서 (strip immunosensor)(66,67) A. screen 프린트한 센서 (Krejci Engineering) 1) 작업 전극 2) 은 기준 전극 3) 고립층(isolating layer) 4) ceramic 지지대 5) 전기선(electrical contacts) B. 나일론 그물 막 C. micell 형성을 위한 tygon관 D. 센서의 조립도.

전기화학적 측정은 경우에 따라서 좀더 감도가 높고 또 광이 투과되게 하기 위하여 반응 매질(reaction media)이 투명하여야 한다는 조건도 없으며, 고정화된 면역종의 큰 용적은 주로 고체지지대의 유효면적을 증가시킴으로 이룩할 수 있다. 그러나 큰 유효면적을 가지는 고체 지지대는 투명하지 않으므로 광을 측정하는 면역센서에서는 거의 사용할 수 없다.

전기화학적 측정은 소형화할 수 있기 때문에 미소 셀(microcell)로 여러 개를 배열할 수가 있다.

Figure 4는 Kalab와 Skladal(66,67)에 의하여 발표된 미소 줄 모양 면역센서(microstrip immunosensor)의 구조이다. 이러한 구조를 서로 배열하여 다중 채널 면역센서(multi-channel immunosensor)의 제작을 가능하게 한다. 이는 미소 제작된 전기화학적 변환기의 기본원리이다.

효소표지에 의하여 촉진된 반응생성물을 높은 감도로 측정할 수 있는 전위차법에 관한 논문이 많이 발표되었다. Alkaline phosphatase는 면역분석을 위하여 널리 사용되어지는 효소 표지물이다. 높은 감도를 가지는 효소반응의 전위차법은 Protein-A(68), 음식물속의 *Salmonella*균(69), apolipoprotein E(70) 그리고 IgG(71) 측정을 위한 면역센서 개발을 위하여 사용되었다.

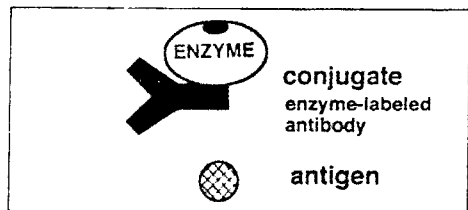
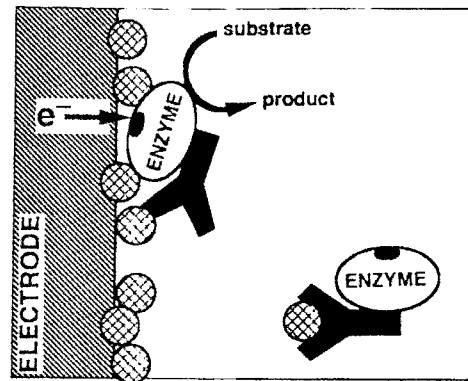
Alkaline phosphatase의 촉매반응 속도상수의 값은 대략  $10^3 \text{ s}^{-1}$ 이고, catalase는  $10^5 \text{ s}^{-1}$ 이다. 후자는 표지 면역종 측정의 감도를 개선하기 위하여 널리 사용되어진 물질이다(72,73). 감도가 높은 것은 pico-molar( $10^{-12} \text{ M}$ ) 농도범위까지 측정이 가능하다. 그러나 면역상호작용의 효율을 개선하던가 비 특이성 결합 방해물질을 줄이지 않으면 그 이상의 감도를 증가시키는 것은 어렵다.

Horseradish peroxidase는 screen print 기술을 이용하는 전위차 면역감지 시스템에서 표지물질로써 사용되어진다(66,67).

McNeil은 glucose-6-phosphate dehydrogenase에 의하여 생성된 NADH의 전기화학적 산화를 검출하는 균일 전위차 면역분석법을 발표하였다(74).

Blackburn과 그의 공동 연구자는 촉매적 항체를 사용하는 방법을 다른 센서구성에 응용하는 법을 제시하였다(75).

Tarasevich는 많은 산화 환원 효소 직접(매개체 없이) 작용 기구에 의하여 전극반응을 촉진하는 능력이 있음을 밝혔다(76). 그러한 경우에 Figure 5와 같이 효소의 활성화 자리(active site)를 통하여 전극으로부터 전자들을 기질분자에 직



**Figure 5.** 효소 촉매 직접 전자 이동을 기본으로 하는 전위차 면역센서의 작용원리(78).

접 운반시킨다. 그러므로 전자(electron)는 효소반응을 위하여 제 2의 기질(second substrate)로써 작용한다. 이것은 대응되는 기질의 존재하에서 전기 촉매적 활성화효소에 의하여 변형시킨 전극의 전위차 변위를 생기게 한다. 이러한 현상은 과전압(overvoltage)의 촉매적 제거(catalytic elimination)반응으로 알려져 있다.

산화-환원 효소의 전기화학적 특성은 전위차 면역센서용 표지물질로써 응용할 수 있게 하였다.

전극표면 위에 고정화한 항원은 효소 표지된 항체와 작용하므로 전극 표면에 효소가 붙게 된다. 그러므로 전극표면 위에 항원-표지 항체 복합체 형성으로 전극의 전위차 변위가 생긴다. 용액속에 비표지 항원과 고정화한 항원은 대응표지 항체에 대하여 경쟁적으로 결합한다.

이와 같은 경쟁적 결합은 전위차의 변위 속도를 줄이게 되고, 이 속도감소는 용액속에 존재하는 비표지 항원의 농도에 비례한다. Laccase는 직접기(direct mechanism)를 통하여 산소 전기 환원(oxygen electroreduction)반응을 촉매시킬 수 있는 효소로 알려져 있다(77).

Laccase-표지 항체와 전기표면 위의 항원 사이에 복합체 형성은 전극전위에 많은 변위가 생기게 된다.

Laccase 표지 면역종을 기초로 하는 면역센서와 항원-항체 상호작용의 직접 전위차 측정법이 Ghindilis와 그의 공동 연구자들에 의하여 개발되었다(78).

과산화 효소(peroxidase)는 과산화 수소의 직접 전기환원(매개체 없이)반응을 촉진할 수가 있다.

McNeil에 의하여 과산화 수소의 전자운반력(electron transfer ability)을 생전기 촉매적 면역센서(bioelectrocatalytic immunosensor)개발에 응용하였다(74).

효소 표지 전기화학적 면역센서들은 화학반응에 생촉매적 촉진을 이용한 것이다. 다시 말하면 높은 효소 활성도와 선택성을, 감도가 높은 전기화학적 검출법과 결합시켜 면역센

서의 기본원리로 이용하였다.

**비효소 표지의 전기화학적 검출 면역센서**

전기화학적 분석기술이 많은 기질 측정에 응용되었고, 면역종과 결합시켰을 때 그러한 기질은 전기화학적 면역 분석에서 신호발생원으로 사용되어질 수 있다. 특히 비효소 저분자량 표지물질이 합텐(hapten)의 면역분석에의 응용은 대단히 흥미를 가지게 하였다.

저분자량 표지 합텐(haptens)들은 막(membrane)을 통하여 표지-감지 전극(marker-sensitive electrode) 쪽으로 확산될 수 있지만, 큰 분자량 표지 합텐-항체 복합체는 막에 의하여 전극 쪽으로 이동되는 것이 억제된다. 그러므로 합텐-항체 복합체 형성은 전극 감응이 감소하게 된다.

시료 안에 포함된 비표지(free, unlabeled) 합텐은 분석 시 경쟁적 과정을 통하여 검출된다. 이 경우 면역분석은 과정이 단순하고, 항원-항체 상호작용이 확산한계(diffusion limitation) 없이, 균일조건(homogeneous condition)하에서 이루어지고, 분석시간은 수초이내의 짧은 시간에 이루어진다.

Nafion으로 변형시킨 전극은 높은 감도로 소수성 양이온의 검출에 이용되었고, 10<sup>-9</sup> M 정도의 저 농도까지 측정 가능함이 입증되었다(79).

그 외 ferrocene(80,81), bismuth와 indium(82)같은 물질들이 비효소적 표지물질의 전기화학적 측정에 사용되었다. 이 기술은 일반적으로 비효소적 표지물질의 높은 감도와 조작이 단순하며, 균일 면역작용을 기초로 하고, 측정시간이 빠르다(실시간)는 이점이 있다.

그러나 분석하려고 하는 물질(경우에 따라서는 접합체 제조도 포함) 중에는 특별한 분석방법의 개발이 요구될 때도 있다. 또 이 방법의 개발이 상품화되어 있지 않는 화학물질을 사용하여야 할 경우에는 더욱더 흥미를 잃게 한다(79-82).

**직접(비표지) 면역 상호작용을 이용한 전기 화학적 검출 면역센서**

경우에 따라서는 항원-항체 복합체 형성으로 어떤 물리적 성질이 변할 때 직접 어떤 표지물질을 사용하지 않고 변환기의 표면(surface)을 면역종(immunoagent)으로 변형시켜 항원-항체 형성으로 표면 성질 변화량을 측정함으로써 검출된다.

전극표면에 항원-항체 복합체 형성으로 인하여 전위차(83,84), 축전용량(capacitance)(59,60) 그리고 전도도(85) 변화 측정을 기본 원리로 하는 직접 면역분석법이 발표되었다.

이들 면역센서의 가장 중요한 이점은 시약 없이(reagentless), 간단하게 측정할 수 있다는 점이지만 센서의 신호(signal)가 표면 고정화 면역종의 질량변화와 함수관계를 가지고 있다.

그러므로 분자량이 작은 분자의 측정을 위해서는 바로 이용할 수 없고 또 비특이성 결합에 의하여 크게 영향을 받는다는 단점이 있다.

**질량 검출 면역센서(Mass detecting immunosensors)**

**압전성 수정결정 면역센서(Piezoelectric quartz crystal immunosensor)**

압전성 결정(piezoelectric crystal)과 음파(acoustic wave)를

이용하여 질량변화를 측정하는 질량검출 면역센서는 변형된 면역센서의 일종이다. 압전성 결정(piezoelectric crystal)은 대칭중심이 없는 비등성 천연결정(anisotropic natural crystal)내에 생성된 전기 쌍극자(electric dipoles)를 기계적 변형(mechanical stress)을 받게 한다. 그러면 그들은 9-14 MHz 사이의 진동수를 가지며 진동한다. 이러한 압전성(piezoelectricity)은 1880년에 처음으로 발견되었으며(86), 천연 압전성 결정은 수정(SiO<sub>2</sub>), lithium niobate(LiNbO<sub>3</sub>), 산화아연(ZnO), gallium arsenide (GaAs), cadmium sulfide(CdS), lithium tantalate (LiTaO<sub>3</sub>), tourmaline과 rochelle 염 등 20여 가지가 있고(87), 약간의 인공적으로 만든 ceramics와 고분자 물질도 압전성을 가지고 있다. 이들 중 수정(quartz)은 수용액속에서도 화학적 안정성을 가지며, 소실없이 고온까지 압전성을 유지하기 때문에 압전성 물질로 가장 널리 사용되어진다. 압전성 결정을 이용한 바이오 센서(piezoelectric crystal biosensor)는 측정하려고 하는 검체와 선택적으로 작용하는 흡착체를 표면에 입힌 진동 결정판(oscillating crystal plate)에 측정하려는 검체의 흡착으로 결정판의 무게가 증가되므로, 증가된 무게만큼 진동자의 공명진동수가 감소된다. 압전성 물질로 AT-Cut 수정진동자를 사용한 압전수정 결정 디바이스(piezoelectric quartz crystal device)에서는 진동수와 질량과의 관계는 Sauerberg식으로부터 다음과 같은 식을 얻는다(88).

$$\Delta F = \frac{-2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}} \cdot \Delta m$$

$$\Delta F = -2.26 \times 10^6 F_0^2 \Delta m/A$$

여기서 ΔF는 측정된 진동수 변화(Hz)이며, F<sub>0</sub>는 AT-Cut 수정 진동자 표면의 고유진동수로서 9×10<sup>6</sup> Hz이다. Δm은 진동자표면의 무게 변화이며, A는 금전극의 면적으로 0.2 cm<sup>2</sup> 이고, ρ<sub>q</sub>는 수정자의 밀도로서 2.65 g/cm<sup>3</sup>이며, μ<sub>q</sub>는 탄성률로서 2.95×10<sup>11</sup> dyn/cm<sup>2</sup>이다. 만약 사용한 수정 결정 진동자의 진동수 1 Hz 변화에 대하여, 무게 변화가 1.25±0.01 ng으로 변환한다면 위의 식은 다음과 같이 나타낼 수 있다(89).

$$\Delta m = -(1.25 \cdot 0.001) \times 10^{-9} \Delta F$$

압전 수정 결정 센서(piezoelectric quartz crystal sensor)장치의 구성은 Figure 6과 같다(90). 이 관계는 간단하고 명확한 방법으로 질량표면 밀도(mass surface density)와 예상되는 진동수 감소와의 관계를 나타낼 수 있지만, 공명진동수(resonant frequency)는 표면질량의 무게에 의존할 뿐 아니라 온도나 압력 같은 주위 조건, 시험 용액(test solution)의 물리적 성질, 또 수용체 층(receptor layer)의 탄성(elasticity) 시험용액의 점도(viscosity)나 전도도(conductivity)에도 의존하므로 질량 축적(mass accumulation)을 정확하게 측정하려면 주의 깊게 이들을 조절하지 않으면 안 된다. 그리고 취급과 포장이 어렵다.

압전 면역센서는 첨가 약품없이 직접 면역상호작용을 측정할 수 있다는 이점이 있으나, 표지(label)할 필요가 있고, 또 비특이적 결합물질로 인하여 측정값의 신뢰성이 떨어지는 단

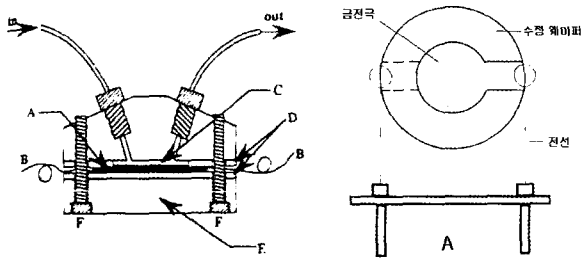


Figure 6. 압전 면역센서의 진동자와 흐름셀(flow cell)의 횡단 구조 그림(cross section)(90) A. 진동자(수정결정) B. 구리선 C. 백금 흑(Pt black) D. 실리콘 고무링(ring) E. 아크릴 레진 F. 나사.

접이 있다. 만약 표지를 하지 않았을 경우 실제 면역상호작용과 진동자 표면에 반응 매개물 중 어느 성분의 비특이성 결합인지 구별하기가 어렵다.

또 측정하려는 항원의 분자량이 큰 경우에 면역복합체(immunocomplex)의 형성으로 진동수 변화가 크지만 작은 분자량의 항원들(haptens)은 충분한 진동수 변화가 일어나지 않는다. 그러므로 압전 면역센서는 주로 비교적 큰 분자량을 가진 면역종의 측정에 응용되어진다.

미량의 무게 변화를 측정하는 면역센서(microgravimetric immunosensor)로 IgM(91), hemoglobin(92), human erythrocytes(93,94), human T-lymphocytes(95), 바이러스(virus)와 박테리아(bacteria)(96,97)를 측정하였고, Aberl와 그 동료들은 HIV의 비표지 항체측정을 위하여 압전측정원리를 이용한 유동 면역 분석(flow through immunoassay)에 관하여 발표하였다(98). 압전면역센서에 의하여 작은 분자량을 가진 hapten들의 측정을 위하여 목표 분석물을 단백질 분자로 접합시켜 경쟁적 반응(competitive scheme)에 의하여 측정한다(99).

Methamphetamine을 압전 면역센서의 진동자 표면에 고정시키고, 분석과정은 비표지 항체와 목표 분석물(target analyte)을 반응용액에 넣고 methamphetamine로 변형시킨 면역센서 표면에 항체와 목표분석물과 경쟁적으로 결합시킨다(100).

이러한 방법은 haptens과 같이 작은 분자량을 가진 물질을 압전 면역센서로 측정하는 데 사용되어진다. 그 외 첨가물을 쓰는 방법이 있지만 직접 측정이라는 이점을 상실하게 된다. 압전 결정 표면 위에 항체의 고정화법은 많은 방법들이 연구되고, 발표되었다. 그중 흡착법(adsorption)은 HIV항체 등 여러 가지 항체의 검출에 널리 이용되어졌다. Protein A는 살충제(pesticides), 박테리아(bacteria), 바이러스(virus), 그 외 항체 고정시 전처리 도포물질(precoating)로 많이 사용되어졌다. Protein G는 cocaine에 대한 항체고정(101)에, HEMA-MMA의 공중합체는 사람 IgG와  $\alpha$ -fetoprotein 측정(102)에, 그 외 glutaraldehyde로 활성화한 polyethyleneimine, 전도성 고분자막(electropolymerised films)이 사용되었고(103), Langmuir-Blodgett 막도 항-형광지방(anti-fluorescein lipids)검출(104)에 사용되었고, 금과 유황간의 강한 결합력을 이용하여 thiols과 disulphides의 자기 조립 단분자(self-assembled monolayers (SAM))막은 압전 결정의 금 전극 위에 항체고정을 위하여 사용되었다(105-107). 항체와 thiol 복합체를 형성시켜, 항체-SAM으로 고정화하기도 한다(108,109). Ebersole와 그 외 동료들은 금 표면 위에 avidin-streptavidin 단분자(monolayer)막의 자기조립 형성가능성을 보이고 AMISA법을 개발하여 측

정한계를 넓히는데 이용하였다(110). 일반적으로 면역종이 전극 표면에 충분한 양이 고정화되어야 하고, 항체의 방향성(orientation)과 측정 과정 중 안정화가 되어야 하므로, 비록 고정화 기술이 문헌에서 상세히 기술되어 있지만 주어진 측정을 위하여 적당한 방법을 선택하는 것은 매우 중요하다. 압전 면역센서는 결정표면에 단일 또는 다층(multi step) 결합을 할 수 있다. 단층은 변형된 결정표면에 한 성분의 결합을 측정하고 다층법은 둘 또는 그 이상 성분들이 계속 결합되어 측정된다.

**표면 음파 면역센서(Surface acoustic wave immunosensor, SAW)**

표면음파(surface acoustic wave, SAW)는 바이오센서 제작에도 이용된다. 이 방법은 압전성 결정의 진동이 9-14 MHz 인데 비하여 SAW결정은 30-200 MHz의 높은 진동수를 가진다. 표면음파(SAW)는 interdigital 변환기로 알려진 것으로서 섞여 짜듯이 만든 금속전극(interlace metal electrode)에 교차로 전압을 변화시켜 생성시킨다. 결정에 시료가 흡착되면 음파(acoustic wave)의 속도가 늦어진다. 속도의 변화는 검체의 농도에 의존하지만 질량외에 온도, 압력, 그리고 표면 전도 같은 요인에 의하여서도 변화된다. 음식물 속의 항원이나 사람 IgG 측정에 응용되었고(111,112), 음파면역센서에서도 비특이성 물질의 결합으로 인하여 측정값의 신뢰성이 줄어드는 문제는 없앨 수가 없다.

**광 면역센서(Optical immunosensor)**

면역반응(immunointeraction)의 결과에 따라 광파(light wave)의 진폭(amplitude), 파장(wave length), 상(phase), 편광상태(polarization), 그리고 시간에 따른 파의 모양(wave form) 중의 하나 또는 그 이상의 변화량을 측정하는 광 면역센서들은 주로 다음과 같이 세 가지 형태로 측정된다.

- 1) 면역반응을 직접(비표지) 측정하는 광 센서
- 2) 표지(주로 fluorescent로 표지) 면역종(immunospecies)의 광학적 측정
- 3) 표지 효소의 촉매로 변환(transformation)된 결과물로서, 효소반응 생성물의 광학적 측정

광 변환기를 이용하는 면역센서는 표지를 할 수도 있고, 하지 않기도 한다. 효소나 형광물의 표지는 검출물의 신호변화량을 명확하게 측정하기 위하여 한다. 비표지 직접 광 센서는 현재 사용되는 면역센서 중에서 가장 많이 연구되고 있고, 상품화된 것도 많다. 광 면역센서는 Table 1과 같이 감쇠총 내부반사(attenuated total internal reflection)(113), ellipsometry(114), SPR(115), 그리고 단일양식 유전 도파관(monomode dielectric waveguide)(116) 등으로 구분되고, Figure 7과 같은 변환기를 사용한다(117).

**간접 광 면역센서(Indirect optical immunosensor)**

발광 박테리아(luminous bacteria)를 이용한 광섬유 생 루미네센서(fiber-optical bioluminescence sensor)는 luciferin-luciferase와 같은 효소를 광섬유에 고정화하여 사용한다. Luminol-과산화물계 등을 포함하는 화학 루미네센서(chemiluminescence)는 광섬유 면역센서 제작에 이용하여 estradiol,  $\alpha_2$ -interferon,



Table 1. 광 면역센서의 종류

간접측정	
루미네센스 (luminescence)	생루미네센스 (bioluminescence) 화학루미네센스 (chemiluminescence)
직접측정	
형광(fluorescence) → 반사율(reflectance) 타원편광반사 (Ellipsometry) SPR 도파관(waveguide)	BIAcore 광섬유도파관 (fiber-optic waveguide) 간섭측정(interferometers) → Mach-Zehnder 차이(difference) 회절발 커플러(grating couplers) → 입력(input), 출력(output) IASys

생 루미네센스와 화학 루미네센스를 측정하여 간접적으로 검출 물질의 양을 측정하는 광센서는 다른 종류의 광 센서와는 달리 광원(light source)이 필요 없으므로 기구 구조가 간단하다.

**직접 광 센서(Direct optical immunosensor)**

센서 표면에서 광의 흡수, 형광, 광산란(light scatter) 또는 반사율(reflective index)의 근소한 변화를 직접 측정하는 광학 기술을 이용한 광 면역센서 기술은 앞으로 대단히 유망한 분야이다.

내부반사 분광법(internal reflectance spectroscopy)을 기초로 하는 직접 광 센서는 1960년 후반, 1970년 초에 처음 발표되었다(120,121). 직접 광 센서는 간접 광 센서보다 더 많은 이점을 가지고 있으나, 비특이성 결합에 의한 측정값의 신뢰성 저하와 분자량이 작은 생체물질은 낮은 감도를 나타내는 문제점을 가지고 있다. 그러므로, 경우에 따라서는 형광으로 표지한 물질을 SPR법으로 직접 측정하는 등 두 방법의 좋은 점만 결합하여 감도를 증가시키기도 한다(122).

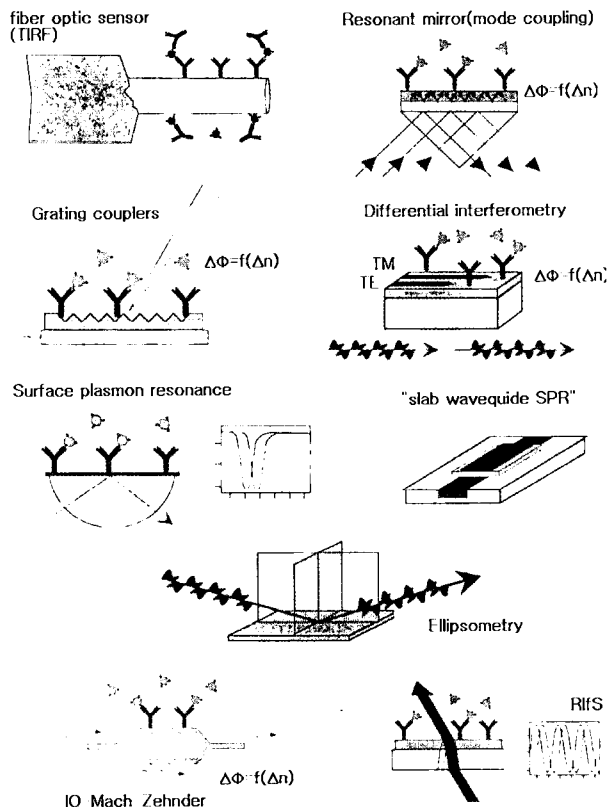


Figure 7. 광 바이오센서 변환기 원리의 개략적 설명도(117).

hCG, 총 IgG 그리고, influenza virus에 대한 항체 측정을 위하여 연구되었다(118,119). 그러나, 루미네센스 센서는 시약을 재충진 해주어야하는 문제점이 있다. 또, 기질과 비가역적 산화가 일어나기 때문에 루미네센스 물질을 과량 사용하지 않으면 안되고, 광섬유 센서의 크기를 소형화하려고 할 때, 작용시간 동안 루미네센스 물질이 흘러나오게 하기 위하여 많은 양이 필요한데 이것을 유지하기가 어렵다.

**형광(Fluorescence)**

형광 측정을 위한 면역센서는 디바이스의 표면에 고정된, 측정하려는 항원에 결합되는 형광 표지 항체로부터 발생하는 광을 측정한다. 예로서 광섬유로서는 IgG를 1.5 mg/L을, slide waveguide로서는 3.0 mg/L의 측정한계를 가지는 면역센서를 그리고 methotrexate를 slide waveguide로는  $2.7 \times 10^{-7}$  mol/L의 측정한계를 가지는 광 면역센서에 관한 연구 결과를 발표하였다.

형광검출 면역센서의 다른 예는 형광 모세관 충전 디바이스(fluorescence capillary fill device, FCFD)(123)이다. 이 방법으로는 혈청 항역항체(serum rubella antibody)를  $4.5 \times 10^{-11}$  mol/L(124)로 hCG(125) 그리고 혈액 전립선 특이항원(126)은  $3.3 \times 10^{-12}$  mol/L의 측정한계를 가지는 면역센서가 발표되었다. 이 방법은 조작성이 간단하고, 사용한 시료체적을 측정할 필요가 없고, 제작 가격이 싸고, 45°C에서 6개월간 활성도가 변하지 않기 때문에 상품화 면역센서로서 가능성이 크다(127).

**반사(Reflectance)**

감쇠 총 반사(attenuated total reflection)측정은 소멸파(evanescent)로부터 흡수된 광 에너지를 내부 반사광선(internally reflected light beam)의 감소로서 측정하는 내부 반사 분광법(internal reflection spectroscopy, IRS)의 일종이다. IRS센서의 표면에 광 흡수 피막(film)을 만든 후, 입사광을 윗 표면(upper surface)으로 비추면 이 피막에 의하여 흡수된다. 이 기술은 적외선, 가시선 그리고 자외선 영역에서 생체물질의 상호작용을 검출할 수 있게 한다. 감쇠 총 반사는 항원-항체 상호작용 연구에 응용되어 OBA™라는 상품화된 면역센서가 개발되었다(128). 이는 항원 또는 항체가 고정화된 silicon 표면에 광을 쬐었을 때 고정화된 면역종에 항원이나 항체가 결합된 양에 따라 표면 위에 회절(grating)을 일으켜 표면으로부터 광의 회절의 크기에 따라 측정량을 검출하는 방법으로 혈청속 hCG의 양을 검출하는데 이용되었다.

### Ellipsometry

Ellipsometry는 평면층 구조(planar layered structure)로부터 반사된 광의 편광(polarization)상태의 변화를 측정하는 장치로서 그림에서 보는 바와 같이 거울면(mirrored surface)으로부터 일단 반사되면 편광은 상(phase)과 진폭(amplitude)이 달라진다(129). 이러한 성질은 표면에 분자가 흡착되었을 때 달라지므로 RI(reflective index)변화로 결합된 면역종의 양을 계산하고 또 흡착된 두께를 계산할 수 있다. "Isoscope<sup>TM</sup>" ellipsometry (Sagax Instruments)라는 상품으로 개발되어 receptor-ligand 반응(130)과 면역센서로서 gamma-interferon과 사람 혈청 알부민(131) 그리고 고체 지지체에 고정화 면역글로빈의 면역활성도 연구에 이용되어졌다(132).

### 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance)

광의 SPR 현상은 1902년에 알려졌고 현재 이용되고 있는 SPR 광학기기는 Kretschmann SPR형, 진동거울(vibrating mirror) SPR형, 그리고 단일 SPR형이 있다. SPR 광학기기는 측정하려는 물질(sample)과 프리즘 사이에 금속 박막(thin film)이 있는 것이 IRS와 차이가 있다(133). 이때 사용되는 금속은 주로 금이나 은이며, slide glass 위에 피복한 금속박막 표면에 항원이나 항체를 고정화한 후 프리즘 위에 놓고 측정하려는 면역종이 들어있는 시료를 직접 작용시킨다. 이때 항원-항체 복합체 생성 정도에 따라 표면 플라즈몬(surface plasmons)은 표면장력처럼 금이나 은 금속의 표면에 있는 전자들이 bulk속 에 있는 전자와 다르기 때문에 생긴다. Plasmon은 복사(radiative)와 비 복사(nonradiative)의 두 종류가 있다. 비 복사는 바이오센서 연구에 많이 이용되고 있으며, 비 복사 플라즈몬은 유리 프리즘을 통하여 금속막(metal film)에 쏘여진 광에 의하여 여기(excited)된다. 여기(excited)되었을 때 표면 플라즈몬은 광 에너지를 흡수하여 소실파(evanescent)를 생성시킨다. 이 파는 시료층을 통과할 때 진폭을 지수 함수적으로 감소시키므로 bulk 금속 속에 있는 전자와 다른 진동수를 가진다. 소실파는 SPR처럼 프리즘 내면(interface)에 평행하게 전파되지 않고, 금속층에 직각으로 다시 향하게 된다. 이러한 현상은 금속과 시료내면(sample interface)(센서표면)사이의 상태를 측정 가능하게 한다. SPR 광 측정기의 공명각(resonance angle)은 계의 시료 층 두께와 프리즘, 금속의 굴절율과 같이 입사광의 편광상태와 파장에 의하여 결정된다. 모든 다른 요소(factor)가 일정할 때 공명각( $\theta$ )은 SPR 광학기 표면에서의 반사율(RI)을 측정하고, 이 변화량은 센서표면에서 항원, 항체의 상대 면역종의 결합량에 따라 변한다. 반사광의 강도 변화량을 계속 측정하면 공명각은 센서 표면에서 RI변화 과정을 직접 측정하게 되고 이것은 반응내에 결합 상태를 실시간 분석할 수 있게 된다. SPR을 이용하여 BIAcore<sup>TM</sup> (Biosensor, Uppsala, Sweden)과 상품이 개발되어 생체물질의 상호작용을 비표지 실시간 측정에 널리 이용되고, 여러 가지 생체물질들의 반응속도 측정에도 응용되었다(134). 최근 SPR 면역센서는 감도를 증가시키기 위하여 형광을 표지하여 만든 SPR 형광 면역센서는 혈액속 hCG 검출에 성공하였고(122), Latex 입자를 이용하여 항원 검출에서 감도를 증가시키기 위하여 고 플라즈몬 공명 저해 시험(enhanced surface plasmon resonance inhibition, ESPRIT)이 발표되었다(135).

### 도파관(Waveguide)

도파관과 SPR은 디바이스의 표면에서 소실파(evanescent)를 생성시킨다는 면에서는 아주 비슷하다. 그러나 SPR에서는 금속층 안 표면 플라즈몬이 여기(excited)되고, 도파관에서는 광과 자신이 유전층(dielectric layer)안에 여기된다. 도파관은 낮은 RI를 가지는 두 유전(dielectric) 물질 사이에 높은 RI 유전막을 끼워넣어 만든다. 광 칩(chip)과 광 섬유(fiber)의 크기로 도파관을 축소하여 집적화(integration)할 수 있다(136). 도파관법을 IO(integrated optics)에 적용한 예는 광 섬유(fiber optics) 간섭기(interferometers), 회절발 커플러(grating coupler) 그리고 최근에 IAsys<sup>TM</sup> 디바이스(Fisons Applied Sensor Technology, Cambridge, UK) 같은 상품들이 생산되고 있다.

### 광 섬유 도파관(Fiber optic waveguides)

도파관을 섬유형태로 만든 것이다. 즉 높은 RI 원주형 중심부를 유리나 수정 그리고 고분자 물질로 만들고 그 주위에 낮은 RI로 양쪽 끝부분을 도금한다. 광을 섬유 끝으로 비추면 시료매질과 중심부 사이의 계면에서 총 내부 반사(total internal reflection)를 받는다. 이때 결합 또는 흡수가 섬유의 도금하지 않은 표면의 소멸장(evanescent field)안에서 시료와 고정화 생체 물질사이에서 일어나므로 반사광을 측정하여 검체를 정량한다. 광섬유 도파관은 면역센서 개발에 유용하며 cocaine 측정용 광섬유 면역센서에 대한 연구결과를 발표하였다(137,138).

### 간섭기(Interferometers)

간섭기는 반사율(RI), 변위(displacement) 그리고 표면균일성(surface flatness)을 측정하기 위하여 사용되어지며, 생체물질 결합의 비표지 분자친화도 분석을 위한 IO 바이오센서(intergrated optical biosensor) 제작에 유용하게 사용되어진다(139).

Fabry-Pérot interferometer는 단일 일양식 채널 도파관(single monomode channel waveguide)(140)이고, Mach Zehnder 간섭계는 단일 편광파를 전기장과 자기장으로 두 성분의 부분파로 나눈다. 이는 디바이스 안에 상이한 거울 사이에서 반사되는데 한 성분은 시료와 작용하여 상(phase)이 변한다. 그러므로 두 편광이 출력시 재 결합될 때 간섭형이 달라지며 그 차이로 측정량을 얻을 수 있다. 시차 간섭계(difference interferometer)(141)는 Mach-Zehnder 간섭계와 유사하며 두 양식 박막 도파관(two-mode interferometric thin-film waveguide)(142)을 사용하는 데 항원-항체 반응과 같은 생체물질의 비표지 분자 친화도 분석의 직접 면역센서에 응용된다(143). 분자인식 성분(receptor)을 센서표면에 고정화하여 편광 레이저 빔(polarized laser beam)을 도파관의 밀면(butt-face)위에 비추면 TE와 TM의 편광화(polarizations)를 촉진시켜 센서표면에서 도파관물질(높은 RI) 박막을 통하여 소멸장(evanescent)이 형성되고 센서 표면을 가로질러 반대편쪽으로 소멸장이 진행될 때 센서표면 위에 고정화 물질(receptor)과 상호작용을 한다. 이때 TE와 TM의 유효 굴절률(refractive indices)의 변화를 일으킨다. 디바이스로부터 생성된 두 편광화 쌍, TE와 TM 사이에 상대 상(relative phase)의 변화를 연속적으로 측정할 때 센서 표면에서 표면의 농도를 측정할 수 있다. 이러

한 방법으로 혈청속 Hepatitis B 항체의 한계 농도를  $2.0 \times 10^{-13}$  mol/L로 측정되었다. 이 시차간섭기는 넓은 영역에서 항원-항체와 같은 생체물질의 상호작용을 높은 감도를 가지고, 실시간 측정에 응용할 수 있다. 평면 도파관 간섭 면역센서(planar waveguide interferometric immunosensors)는 표면에 고정화된 항체의 면역상호작용 연구에 이용되어진다(144).

**회절발 커플러(Grating couplers)**

이 기구는 입력 레이저 빔(input grating coupler)(145) 또는 출력 레이저 빔(output grating coupler)(146)의 디바이스 표면 소멸파 안의 RI에 비례하는 짝지움 각(coupling angle)을 측정한다. 회절발 커플러는 낮은 RI 물질층(보통 유리 RI=1.64)과 높은 RI의 도파관 막(SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>, RI=1.75-1.82) 사이에 끼워 넣고, 편극광(polarized light)을 디바이스 안으로 통과시키면 회절발(grating)은 도파관 밖 또는 안에서 광의 짝지움을 일으킨다. 그렇게 하여 도파관과 시료의 계면에서 소멸파를 형성시킨다. 이때 짝지움 각 변화를 측정하여 농도를 측정한다.

**SPR과 간섭원리의 결합**

IASys(147)은 SPR 기술과 시차 간섭계와 같은 도파관 기술을 결합시킨 새로운 광 바이오센서이다. 구조는 SPR과 비슷하지만, 금속층(SPR의)을 높은 RI의 유전공명층(dielectric resonance layer)으로 바뀌어진 것으로 맨 윗층 생체물질의 고정화를 위한 dextran막이 있고, 그 밑에 높은 굴절 공명(resonance)층, 낮은 굴절 결합(coupling)층 그리고, 높은 굴절 유리 프리즘의 세 층으로 "sandwich"처럼 되어있다. IASys에서도 TE와 TM 편광을 각각 측정하는데 TE편광은 TM보다 뚜렷한 공명 피크를 가지고 공명각 변화를 더 예민하게 측정하므로 굴절률을 정확하게 측정할 수 있다. IASys는 SPR보다 센서 표면에서의 RI 변화를 더 정확하게 연속적으로 측정이 가능하므로 반응속도, 항체의 항원결합 부위와 반응하는 항원 분자상의 구조단위인 항원 결정기(epitope)의 규명, 실시간 측정 가능기기이다. 비록 다른 광 면역센서의 변화기보다 여러 가지 장점이 있지만 간섭, 대수응답시간(log response times), 시약상의 누출(leakage of the reagent phase) 등 문제점이 있으나, 항원-항체 상호작용을 실시간 측정하는 광 면역센서로 널리 응용되어진다. 이와 같이 광학적 방법과 전기화학적 방법의 결합 즉, 전기화학적 계면에서의 SPR 측정, 전기화학적 으로 발생하는 발광 측정 등이 앞으로 연구되고 있고, 성공 단계에 있는 것도 있다(148).

**광 칩 면역센서(Optical chip immunosensor)**

바이오 칩(biochip)은 여러 가지 물질(multiple analytes)을 분석하기 위하여 개별적으로 측정이 가능한 개개의 바이오센서를 배열하여 Figure 8과 같이 다중채널(multi channel) 바이오센서 제작에 이용된다(149). 바이오 칩(biochip)은 생 수용체(bioreceptor)와 변환기(transducer)의 종류에 따라 다양하다 (1). 그 중 광 칩(optical chip)은 단일평판형 광선(single planar light beam)을 다중 간섭계에 보내는 Hartman 간섭계의 원리를 이용한 것이 있다. 신호 감지 영역(signal sensing region)위에서 특이 항체에 항원의 결합으로 표면층의 굴절률 변화를 일으킨다. 참조 감지 영역에는 다른 항체를 도포하여

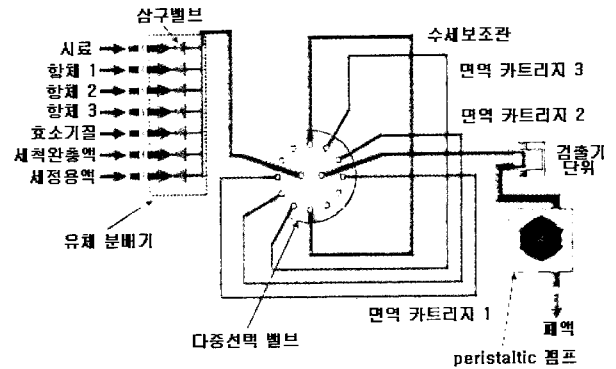


Figure 8. 광 흐름 셀 다중 채널 면역센서(optical flow-cell multi channel immunosensor)의 구조(149)

임상측정시 특이 감지 영역에서 일어나는 비특이성 흡착량을 보정해 주기 위하여 사용된다. Hartman 간섭계 원리로 제작된 광 칩을 이용하여 혈청속의 hCG 0.1 ng/mL 농도를 측정하였다(150). 그 외에도 광 트랜지스터 적분회로 미소칩(phototransistor integrated circuit microchip)을 이용한 적분 바이오 칩(integrated biochip)(151) 등 여러 가지 광 칩(optical chip)에 대한 연구 보고가 있다.

**결론**

혈액 등 체액 중에는 건강 상태나 환자의 종류에 따라 각종 물질들이 극 미량 함유되어 있으므로 이들 물질들의 정밀한 측정은 건강진단과 진료에 중요한 정보를 제공한다. 이러한 정보를 얻기 위하여 지금까지 물리적 수단인 전기, 질량, 광의 특성을 이용하여 생체 내에서 일어나는 항원-항체간 면역작용의 결과를 측정하는 방법들의 원리와 특성 그리고 측정 예를 보았다. 1950년대 말부터 항체를 이용하여 항원의 양을 정량한 이래 40년이 지났지만 최근에 와서야 광의 특성을 이용한 방법들 중에 상품화 된 것이 많지 않고, 측정 대상 물질도 한정 되어있다. 그러나 각 처에서 실시간(real time)으로 시약을 사용하지 않고(reagentless), 일회용(disposable), 재생(regeneration)가능, 자동화하고, 측정시간을 단축시키고, 감도를 증가시키며, 측정할 수 있는 농도 범위를 넓히고, 다양한 종류의 생체 기질에 적용시키고, 또 측정방법의 종류를 확대하고, 다양하게 하여 실험실과 검사실에서만 이루어지던 면역 분석 기술을 병실 환자 침대에서 이루어질 수 있도록 연구를 하고 있다. 본 논문은 이러한 목적에 조금이나마 기여하고자 한다.

**REFERENCES**

1. Vo-Dinh, T. and B. Cullum (2000), Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**, 540-551.
2. Gottschalk, A. (1988), Diagnostic nuclear medicine. ed 2, *Baltimore Williams & Wilkins*
3. Ullman, E. F. and P. L. Khanna (1981), Fluorescence excitation transfer immunoassay(FETI). In: Langone, L., H. Van Vunakis eds. *Methods in enzymology:*

- immunochemical techniques. *New York: Academic Press*, 28-60.
4. Kricka, L. J. (1991), Chemiluminescent and bioluminescent techniques [Review]. *Clin Chem.* **37**, 1472-1481.
  5. Price, C. P. and D. J. Newman (1991), Light scattering immunoassay. In: Price, C. P., and D. J. Newman eds. Principles and practice of immunoassay. *London: Stockton Press*, 446-481.
  6. Engvall, E. and P. Perlmann (1971), Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
  7. Price, C. P. and D. J. Newman eds. (1991), Principles and practice of immunoassay. *London: Stockton Press*, 643.
  8. Miyai, K. and C. P. Price (1992), Problems for Improving performance in immunoassay. *JIFCC*, **4**, 154-163.
  9. Harlow, E. and D. Lane (1988), *Antibodies: A laboratory Manual*. CRC Press, Cold Spring Harbor, New York, p 553.
  10. Palmer, D. A. and J. N. Miller (1995), Thiophilicgels: applications in flow-injection immunoassay for macromolecules and haptens. *Anal. Chim. Acta* **303**, 223-230.
  11. Nilsson, M., H. Hakason, and B. Mattiasson (1992), Process monitoring by flow-injection immunoassay. Evaluation of a sequential competitive binding assay. *J. Chromatogr.* **597**, 383-389.
  12. Abdel-Hamid, I., P. Atanasov, A. L. Ghindilis, and E. Wilkins (1998), Development of a flow-through immunoassay system. *Sensors and Actuators B* **49**, 202-210.
  13. Yalow, R. and S. Berson (1959), Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, **184**, 1648-1649.
  14. Rogers, K. R. (1995), Biosensors for environmental applications. *Biosensors & Bioelectronics* **10**, 533-541.
  15. Ursula, E. (1998), Spichiger-Keller Chemical sensor and Biosensors for Medical and Biological Applications. *WILEY-VCH*
  16. Ziegler, C. and W. G'öpel (1998), Biosensor development. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2(5)**, 585-591
  17. Simpson, D. L. and R. K. Kobos (1983), Potentiometric microbiological assay of gentamicin, streptomycin and neomycin with a carbon dioxide gas-sensing electrode. *Anal. Chem.* **55**, 1974-1977.
  18. Fonong, T. and G. A. Rechnitz (1984), Homogeneous potentiometric enzyme immunoassay for human IgG. *Anal. Chem.* **56**, 2586-2590.
  19. Keating, M. Y. and G. A. Rechnitz (1985), Potentiometric enzyme immunoassay for digoxin using polystyrene beads. *Anal. Lett.* **18**, 1-10.
  20. Connell, G. R., K. M. Sanders, and R. L. Williams (1983), Electroimmunoassay. A new competitive protein binding assay using antibody-sensitive electrodes. *Biophys. J.* **44**, 123-126.
  21. Keating, M. Y. and G. A. Rechnitz (1983), Cortisol antibody electrode. *Analyst* **108**, 766-778.
  22. Keating, M. Y. and G. A. Rechnitz (1984), Potentiometric digoxin antibody measurements with antigen-ionophore-based membrane electrodes. *Anal. Chem.* **56**, 801-806.
  23. Bush, D. L. and G. A. Rechnitz (1987), Antibody response of polymer membrane electrodes incorporating antigenic ionophores. *J. Membr. Sci.* **30**, 313-322.
  24. Bush, D. L. and G. A. Rechnitz (1987), Monoclonal antibody biosensor for antigen monitoring. *Anal. Lett.* **20**, 1781-1790.
  25. Bergveld, P. (1970), Development of an ion-selective solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Trans Biomed. Eng.* **17**, 70-71.
  26. Schasfoort, R. B., R. P. Kooyman, P. Bergveld, and J. Greve (1990), A new approach to immunoFET operation. *Biosens. Bioelectron.* **5**, 103-124.
  27. Ghindilis, A., O. Skorobat'ko, V. Gavrilova, and A. Yaropolov (1992), A new approach to the construction of potentiometric immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* **7**, 301-304.
  28. Hayes, F. J., N. B. Halsall, and W. R. Heineman (1994), Simultaneous immunoassay using electrochemical detection of metal ion labels. *Anal. Chem.* **66**, 1860-1865.
  29. Scheller, F., D. Kirstein, L. Kirstein, F. Schubert, U. Wollenberger, and B. Olssen (1987), Enzyme electrodes and their application. *PhilosTrans R Soc Lond B Biol. Sci.* **316**, 85-94.
  30. Wilson, G. S. (1987), Fundamentals of amperometric sensors. In: Turner A. P. F., I. Karube, G. S. Wilson eds. Biosensors. Fundamentals and applications. *Oxford: Oxford University Press*, 165-179.
  31. Aizawa, M., A. Morioka, S. Suzuki, and Y. Nagamura (1979), Enzyme immunosensor III. Amperometric determination of human choriogonadotrophin by membrane bound antibody. *Anal. Biochem.* **94**, 22-28.
  32. Renneberg, R., W. Schlossler, and F. Scheller, (1983), Amperometric enzyme sensor-based enzyme immunoassay for Factor VIII-related antigen. *Anal. Lett.* **16**, 1279-1289.
  33. Doyle, M. J., H. B. Halsall, and W. R. Heineman (1984), Enzyme-linked immunoabsorbed assay with electrochemical detection for  $\alpha_1$ -acid glyco protein. *Anal. Chem.* **56**, 2355-2360.
  34. Meusel, M., R. Renneberg, F. Spener, and G. Schmitz (1995), Development of a heterogeneous amperometric immunosensor for the determination of apolipoprotein E in serum. *Biosens. Bioelectron.* **10**, 577-586.
  35. Pritchard, D. J., H. Morgan, and J. M. Cooper (1995), Simultaneous determination of folliclestimulating hormone and luteinizing hormone using a multi-analyte immunosensor. *Anal. Chim. Acta.* **310**, 251-256.
  36. Treloar, P. H., A. T. Nkohkwo, J. W. Kane, D. Barber, and P. M. Vadgama (1994), Electrochemical immunoassay: simple kinetic detection of alkaline phosphatase enzyme labels in limited and excess reagent systems. *Electroanalysis*, **6**, 561- 566.
  37. Blonder, R., E. Katz, Y. Cohen, N. Itzhak, A. Riklin, and I. Willner (1996), Application of redox enzymes for probing the antigen-antibody association at monolayer interfaces: development of amperometric immunosensor electrodes. *Anal. Chem.* **68**, 3151-3157.
  38. Rishpon, J. and D. Ivnitski (1997), An amperometric enzyme-channeling immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **12(3)**, 195-204.
  39. Wang, J., P. V. A. Pamidi, and K. R. Rogers (1998), Sol-Gel-derived thick-film amperometric immunosensors. *Anal. Chem.* **70**, 1171-1175.
  40. Ivnitski, D. and J. Rishpon (1996), A one-step, separation-free amperometric enzyme immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **11(4)**, 409-417.
  41. Kelly, S., D. Compagnone, and G. Guilbault (1998), Amperometric immunosensor for lactate dehydrogenase LD-1. *Biosensors & Bioelectronics* **13(2)**, 173-179.
  42. Liu, M., Q. X. Li, and G. A. Rechnitz (2000), Gold

- electrode modification with thiolated hapten for the design of amperometric and piezoelectric immunosensors. *Electroanalysis* **12**(1), 21-26.
43. Rachkov, A. E., M. I. Rozhko, T. A. Sergeeva, and S. A. Piletsky (1994), Method and apparatus for the detection of the binding reaction of immunoglobulins. *Sensors. Actuators. B Chem.* **19**, 610-613.
  44. Sandberg, R. G. (1992), A conductive polymer-based immunosensor for the analysis of pesticide residues. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **511**, 81-88.
  45. Sergeeva, T. A., N. V. Lavrik, S. A. Piletsky, A. E. Rachkov, and A. V. El'skaya (1996), Polyaniline label-based conductometric sensor for IgG detection. *Sensors and Actuators B* **34**, 283-288.
  46. Fare, T. L., M. D. Cabelli, S. M. Dallas, and D. P. Herzog (1998), Functional characterization of a conducting polymer-based immunoassay system. *Biosensors & Bioelectronics* **13**(3-4), 459-470.
  47. Kim, J. H., J. H. Cho, G. S. Cha, C. W. Lee, H. B. Kim, and S. H. Paek (2000), Conductimetric membrane strip immunosensor with polyaniline bound gold colloids as signal generator. *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 907-915.
  48. DeSilva, M. S., Y. Zhang, P. J. Hesketh, G. J. Maclay, S. M. Gendel, and J. R. Stetter (1995), Impedance based sensing of the specific binding reaction between *Staphylococcus enterotoxin B* and its antibody on an ultra-thin platinum film. *Biosens. Bioelectr.* **10**, 675-682.
  49. Rickert, J., W. Gopel, W. B. Beck, G. Jung, and P. Heiduschka (1996), A 'mixed' self-assembled monolayer for an impedimetric immunosensor. *Biosens. Bioelectr.* **11**, 757-768.
  50. Maupas, H., A. P. Soldatkin, C. Martelet, N. Jaffrezic, and B. Mandrand (1997), Direct immunosensing using differential electrochemical measurements of impedimetric variations. *J. Electroanal. Chem.* **421**, 165-171.
  51. Patolsky, R., B. Filanovsky, E. Katz, and I. Willner (1999a), Photoswitchable antigen-antibody interactions studied by impedance spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **102**, 10359-10367.
  52. Pei, R., Z. Cheng, E. Wang, and X. Yang (2001), Amplification of antigen-antibody interactions based on biotin labeled protein-streptavidin network complex using impedance spectroscopy. *Biosensors & Bioelectronics* **16**, 355-361.
  53. Maupas, H., C. Saby, C. Martelet, J. P. Nicole, P. S. Alexey, C. Marie-Helene, D. Thierry, and M. Bernard (1996), Impedance analysis of Si/SiO<sub>2</sub> heterostructures grafted with antibodies: an approach for immunosensor development. *J. Electroanal. Chem.* **406**, 53-58.
  54. Bardea, A., E. Katz, and I. Willner (2000), Probing antigen-antibody interactions on electrode supports by the biocatalyzed precipitation of an insoluble product. *Electroanalysis* **12**, 1097-1106.
  55. Beyer, K., M. Reinecke, W. Noe, and T. Scheper (1995), Immunobased elution assay for process control. *Anal. Chim. Acta* **309**, 301-305.
  56. Ogert, R. A., A. W. Kusterbeck, A. Gregory, R. B. Wemhoff, R. Burke, and F. S. Ligler (1992), Detection of cocaine using the flow immunosensor. *Anal. Lett.* **25**, 1999-2019.
  57. Bjarnason, B., N. Bousios, S. Eremin, and G. Johansson (1997), Flow injection enzyme immunoassay of atrazine herbicide in water. *Anal. Chim. Acta.* **347**, 111-120.
  58. Wilson, R., M. H. Barker, D. J. Schiffrin, and R. Abuknesha (1997), Electrochemiluminescence flow injection immunoassay for atrazine. *Biosensors & Bioelectronics* **12**(4), 277-286.
  59. Bataillard, P., F. Gardies, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, B. Colin, and B. Mandrand (1988), Direct detection of immunospecies by capacitance measurements. *Anal. Chem.* **60**, 2374-2379.
  60. Klein, M., R. Kates, N. Chucholowski, M. Schmitt, and C. Lyden (1995), Monitoring of antibody- antigen reaction with affinity sensors: experiments and models. *Sensors & Actuators, B* **26-27**, 474-476.
  61. Palmer, D. A., M. Evans, J. N. Miller, and M. T. French (1994), Rapid fluorescence flow injection immunoassay using a novel perfusion chromatographic material. *Analyst* **119**, 943-947.
  62. Pollema, C. H. and J. Ruzicha (1994), Flow injection renewable surface immunoassay: a new approach to immunoanalysis with fluorescence detection. *Anal. Chem.* **66**, 1825-1831.
  63. Narang, U., P. R. Gauger, F. S. Ligler (1997), Capillary-based displacement flow immunosensor. *Anal. Chem.* **69**, 1961-1964.
  64. Narang, U., P. R. Gauger, F. S. Ligler (1997), A displacement flow immunosensor for explosive detection using microcapillaries. *Anal. Chem.* **69**, 2779-2785.
  65. Ivnitcki, D. M., R. A. Sitdikov, and V. E. Kurochkin (1992), Flow-injection amperometric system for enzyme immunoassay. *Anal. Chim. Acta* **261**, 45-52.
  66. Kalab, T. and P. Skladal (1995), A disposable amperometric immunosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Anal. Chim. Acta* **304**, 361-368.
  67. Skladal, P. and T. Kalab (1995), A multichannel immunochemical sensor for determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Anal. Chim. Acta* **316**, 73-78.
  68. Mirhabibollahi, B., J. L. Brooks and R. G. Kroll, (1990a), An improved amperometric immunosensor for the detection and enumeration of protein A-bearing *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Bacteriol.* **11**, 119-122.
  69. Brooks, J. L., B. Mirhabibollahi, and R. G. Kroll, (1992), Experimental enzyme-linked amperometric immunosensors for the detection of salmonellas in food. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 189-196.
  70. Meusel, M., R. Renneberg, F. Spener, and G. Schmitz (1995), Development of heterogeneous amperometric immunosensor for the determination of apolipoprotein E in serum. *Biosensors & Bioelectronics* **10**, 577-586.
  71. Masson, M., Z. Liu, T. Haruyama, E. Kobatake, Y. Ikariyama, and M. Aizawa (1995), Immunosensing with amperometric detection, using galactosidase as label and *p*-aminophenyl- $\beta$ -galactopyranoside as substrate. *Anal. Chim. Acta* **304**, 353-359.
  72. Mirhabibollahi, B., J. L. Brooks, and R. G. Kroll (1990b), Development and performance of an enzyme-linked amperometric immunosensor for the detection of *Staphylococcus aureus* in foods. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 577-585.
  73. Ghindilis, A. L., A. Makower, C. G. Bauer, F. F. Bier, and F. W. Scheller (1995a), Determination of *p*-aminophenol at picomolar concentrations based on recycling enzyme amplification. *Anal. Chim. Acta* **304**, 25-31.
  74. McNeil, C. J., D. Athey, and W. O. Ho (1995), Direct

- electron transfer bioelectronic interfaces: application to clinical analysis. *Biosensors & Bioelectronics* **10**, 75-83.
75. Blackburn, G. F., D. B. Talley, P. M. Booth, C. N. Durfor, M. T. Martin, A. D. Napper, and A. R. Rees (1990), Potentiometric biosensor employing catalytic antibodies as the molecular recognition element. *Anal. Chem.* **62**, 2211-2216.
  76. Tarasevich, M. R. (1985), Bioelectrocatalysis. In *Comprehensive Treatise of Electrochemistry, 10, Bioelectrochemistry*, ed. S. Srinivasan, Yu. A. Chizmadzhev, J. O'M. Bockris, B. E. Conway & E. Yeager. Plenum Press, New York, New York, p. 275.
  77. Berezin, I. V., V. A. Bogdanovskaya, S. D. Varfolomeev, M. R. Tarasevich, and A. I. Yaropolov (1978), Bioelectrocatalysis. Equilibrium oxygen potential in the presence of laccase. *Dokl. Phys. Chem.* **240**, 455-459.
  78. Ghindilis, A. L., O. W. Skorobogat'ko, V. P. Gavrilova, and A. I. Yaropolov (1992), A new approach to the construction of potentiometric immunosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **7**, 301-304.
  79. Le Gal La Salle, A., B. Limoges, J. Y. Anizon, and C. Degrand (1993), Utilization of Nafionmodified electrode in competitive homogeneous electrochemical immunoassay involving a redox cationic labelled hapten-phenytoin. *J. Electroanal. Chem.* **350**, 329-335.
  80. Suzawa, T., Y. Ikariyama, and M. Aizawa (1994), Multilabeling of ferrocenes to a glucose oxidase-digoxin conjugate for the development of a homogeneous electroenzymatic immunoassay. *Anal. Chem.* **66**, 3889-3894.
  81. Ghindilis, A. L., A. Makower, and F. W. Scheller (1995b), Nanomolar detection of the ferrocene derivatives using a recycling enzyme electrode. Development of the redox label immunoassay. *Anal. Lett.* **28**, 1-11.
  82. Hayes, F. J., H. B. Halsall, and W. R. Heineman (1994), Simultaneous immunoassay using electrochemical detection of metal ion labels. *Anal. Chem.* **66**, 1860-1865.
  83. Engel, L. and W. Baumann (1993a), Direct potentiometric immunoelectrodes. III. A graphite based atrazine immunoelectrode. *Fresenius J. Anal. Chem.* **346**, 745-751.
  84. Engel, L. and W. Baumann (1993b), Direct potentiometric immunoelectrodes. IV. An immunoelectrode for the trace level determination of atrazine by separate incubation and potential measurement step. *Fresenius J. Anal. Chem.* **349**, 447-450.
  85. Taylor, R., I. G. Marenchic, and R. H. Spencer (1991), Antibody- and receptor-based biosensors for detection and process control. *Anal. Chim. Acta* **249**, 67-70.
  86. Curie, J. and P. Curie (1880), Development, par pression, de l'électricité polarize des cristaux hemiedries et faces inclines. *Comp Rend.* **91**, 294-297.
  87. Cady, W. G. (1946), Piezoelectricity. *New York: McGraw Hill*, 186pp.
  88. Sauerbrey, G. Z. (1959), The use of oscillators for weighting thin layers and for micro weighting. *Z. Phys.* **155**, 206.
  89. Suleiman, A. A. and G. G. Guilbault (1991), Piezoelectric (PZ) immunosensors and their applications. *Anal. Lett.* **24**, 1283-1292.
  90. Sakai, G., T. Saiki, T. Uda, N. Miura, and N. Yamazoe (1995) Selective and repeatable detection of human serum albumin by using piezoelectric immunosensor. *Sensors and Actuators B* **24-25**, 134-137.
  91. Suri, C. R., M. Raje, and G. C. Mishra (1994), Determination of immunoglobulin M concentration by piezoelectric crystal immunobiosensor coated with protamine. *Biosensors & Bioelectronics* **9**, 535-542.
  92. Shao, B., Q. Hu, J. Hu, X. Zhou, W. Zhang, X. Wang, and X. Fan (1993), Determination of bovine haemoglobin by a piezoelectric crystal immunosensor. *Fresenius J. Anal. Chem.* **346**, 1020-1024.
  93. Konig, B. and M. Gratzel (1993), Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of human erythrocytes. *Anal. Chim. Acta* **276**, 323-333.
  94. Konig, B. and M. Gratzel (1993), Long-term stability and improved reusability of a piezoelectric immunosensor for human erythrocytes. *Anal. Chim. Acta* **280**, 37-41.
  95. Konig, B. and M. Gratzel (1993d), Detection of human T-lymphocytes with a piezoelectric immunosensor. *Anal. Chim. Acta* **281**, 13-18.
  96. Konig, B. and M. Gratzel (1993a), Detection of viruses and bacteria with piezoelectric immunosensors. *Anal. Lett.* **26**, 1567-1585.
  97. Konig, B. and M. Gratzel (1994), A novel immunosensor for Herpes viruses. *Anal. Chem.* **66**, 341-344.
  98. Aberl, F., H. Wolf, C. Kosslinger, S. Drost, P. Woias, and S. Koch (1994), HIV serology using piezoelectric immunosensors. *Sensors & Actuators, B* **18-19**, 271-275.
  99. Yokoyama, K., K. Ikebukuro, E. Tamiya, I. Karube, N. Ichiki, and Y. Arikawa (1995), Highly sensitive quartz crystal immunosensor for multisample detection of herbicides. *Anal. Chim. Acta* **304**, 139-145.
  100. Miura, N., H. Higobashi, G. Sakai, A. Takeyasu, T. Uda, and N. Yamazoe (1993), Piezoelectric crystal immunosensor for sensitive detection of methamphetamine (stimulant drug) in human urine. *Sensors & Actuators, B* **13-14**, 188-191.
  101. Attili, B. S. and A. A. Suleiman (1996), A piezoelectric immunosensor for detection of cocaine. *Microchem. J.* **54(2)**, 174-179.
  102. Chu, X., J. H. Jiang, G. L. Shen, and R. Q. Yu (1996), Simultaneous immunoassay array and robust method. *Anal. Chim. Acta* **336(1-3)**, 185-193.
  103. Muramatsu, H., J. Dicks, E. Tamiya, and I. Karube (1987), A piezoelectric biosensor modified with protein A for immunoglobulins. *Anal. Chem.* **59**, 2760-2763.
  104. Ebato, H., C. A. Gentry, J. N. Herron, W. Muller, Y. Okahata, H. Ringsdorf, and P. A. Suci (1994), Investigation of specific binding of anti fluorescein antibody and FAB to fluorescein lipids in langmuir-blodgett films using quartz crystal microbalances. *Anal. Chem.* **66**, 1683.
  105. Cohen, Y., S. Levi, S. Rubin, and I. Willner (1996), Modified minolayer electrodes for electrochemical and PZ analysis. Novel immunosensor electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **417**, 65-75.
  106. Storri, S., T. Santorini, M. Minunni, and M. Mascini (1998a), Surface modification for development of piezoimmunosensors. *Biosensors Bioelectron.* **13(3-4)**, 347-357.
  107. Vaughan, R., C. K. O'Sullivan, and G. G. Guilbault (1999), Self assembled monolayer for PZ immunosensors. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **364**, 54-57.
  108. Park, I. S. and N. S. Kim (1998), Thiolated Salmonella antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal. *Biosensors & Bioelectronics* **13**, 1091-1097.
  109. Park, I. S., W. Y. Kim, and N. S. Kim (2000), Operational characteristics of an antibody immobilized

- QCM system detecting *Salmonella* spp. *Biosensors & Bioelectronics* **15**, 167-172.
110. Ebersole, R., J. Miller, J. Moran, and M. Ward (1990), PZ quartz sensors for use in clinical analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 3239.
  111. Howe, E. and G. Harding (2000), A comparison of protocols for the optimization of detection of bacteria using a surface acoustic wave(SAW) biosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **15**, 641-649.
  112. Cavič, B. A., G. L. Hayward, and M. Thompson (1999), Acoustic waves and the study of biochemical macromolecules and cells at the sensor-liquid interface. *Analyst*, **124**, 1405-1420.
  113. Sutherland, R. M. and C. D'ahne (1987), IRS devices for optical immunoassays. In: Turner, A. P. F., Karube, I., Wilson, G. S. eds. *Biosensors. Fundamentals and application*. Oxford: Oxford University Press, 655-679.
  114. Vroman, L., and A. Adams (1969), Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at solid/ liquid interfaces. *Surf. Sci.* **16**, 438-446.
  115. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lundstrom (1983), Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors Actuators* **4**, 299-304.
  116. Nellen, P., K. Tiefenthaler, and W. Lukosz (1988), Integrated optical input grating couplers as biochemical sensors. *Sensors Actuators* **15**, 285-297.
  117. Brecht, A. and G. Gauglitz (1995), Optical probes and transducers. *Biosensors & Bioelectronics* **10**, 923-936.
  118. Starodub, N., P. Arenkov, A. Starodub, and V. Berezin (1994), Constriction and biomedical application of immunosensors based on fiber optics and enhanced chemiluminescence. *Optical Eng.* **33**, 2958-2963.
  119. Starodub, N., P. Arenkov, A. Starodub, and V. Berezin (1994), Fiber optic immunosensors based on chemiluminescence and their application to determine different antigens. *Sensors Actuators B Chem.* **18**, 161-165.
  120. Harrick, N. (1967), Internal reflection spectroscopy. *New York: Interscience*, 274pp
  121. Harrick, N. and G. Loeb (1973), Multiple internal reflection spectroscopy. *Anal. Chem.* **45**, 687-691.
  122. Attridge, J. W., P. B. Daniels, J. K. Deacon, G. A. Robinson, and G. P. Davidson (1991), Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface plasmon resonance fluoroimmunoassay. *Biosens. Bioelectron* **6**, 201-214.
  123. Badley, R. A., R. A. L. Drake, I. A. Shanks, A. M. Smith, and P. R. Stephenson (1987), Optical biosensors for immunoassays: the fluorescence capillary fill device. *Philos Trans R Soc Lond B Biol. Sci.* **316**, 143-160.
  124. Parry, R. P., C. A. Love, and G. A. Robinson (1990), Detection of rubella antibody using an optics immunosensor. *J. Virol. Methods.* **27**, 39-48.
  125. Deacon, J. K., A. M. Thompson, A. L. Page, J. E. Stops, P. R. Roberts, S. W. Whiteley (1991), An assay for human chorionic gonadotrophin using the fluorescence capillary fill device. *Biosens. Bioelectron.* **6**, 193-199.
  126. Daniels, P. B. (1995), A comparison of 3 fluorophores for use in an optical whole-blood. *Sensors Actuators* **27**, 447-451.
  127. Robison, G. A. (1991), Optical immunosensing systems meeting the market needs. *Biosens. Bioelectron.* **6**, 183-191.
  128. Tsay, Y., C. Lin, J. Lee, E. K. Gustafson, P. Appelqvist, and P. Maggini (1991), Optical biosensor assay (OBA<sup>TM</sup>). *Clin. Chem.* **37**, 1502-1505.
  129. Mandenius, C. F., S. Welin, B. Danielsson, I. Lundström, and K. Mosbach (1984), The interaction of proteins and ions with affinity ligands covalently coupled to silicon surfaces as monitored by ellipsometry. *Anal. Biochem.* **137**, 106-114.
  130. Stenberg, M. and H. Nygren (1982), A receptor-ligand reaction studied by a novel analytical tool-the Lscope<sup>TM</sup> ellipsometer. *Anal. Biochem.* **127**, 183-192.
  131. Ruzgas, T. A., V. J. Razumas, and J. J. Kulys (1992), Ellipsometric immunosensors for the determination of  $\gamma$ -interferon and human serum albumin. *Biosens. Bioelectron.* **7**, 305-308.
  132. Tronin, A., T. Dubrovsky, C. Denitti, A. Gussoni, V. Erokhin, and C. Nicolini (1994), Langmuir-Blodgett films of immunoglobulin IgG ellipsometric study of the deposition process and of immunological activity. *Thin Solid Films* **238**, 127-132.
  133. Daniels, P., J. Deacon, M. Eddowes, and D. Pedley (1988), Surface plasmon resonance applied to immunosensing. *Sensors Actuators* **15**, 11-18.
  134. Jönsson, U. and M. Malmqvist (1992), Real time biospecific interaction analysis: the integration of surface plasmon resonance detection, general biospecific interface chemistry and microfluidics into one analytical system. In: Turner, A. P. F. ed. *Advances in biosensors*. London: JAI Press, 291-336.
  135. Severs, A. and R. Schasfoort (1993), Enhanced surface plasmon resonance inhibition test (ESPRIT) using latex particles. *Biosens. Bioelectron* **8**, 365-370.
  136. Tiefenthaler, K. (1992), Integrated optical couplers as chemical waveguide sensors. In: Turner, A. P. F. ed. *Advances in biosensors*. London: JAI Press. 261-89.
  137. Hale, Z. M. and F. P. Payne (1994), Demonstration of an optimized evanescent field optical-fiber sensor. *Anal. Chim. Acta.* **293**, 49-54.
  138. Devine, P. J., N. A. Anis, J. Wright, S. Kim, A. T. Eldefrawi, M. E. Eldefrawi (1995), A fiber optic cocaine biosensor. *Anal. Biochem.* **227**, 216-224.
  139. Marguerre, H. (1992), Optical phase-sensitive detection. In: Wagner, E., Dandliker, R., Spenner, K. eds. *Optical sensors*. Weinheim: VCH, 307-331.
  140. Hernandez, G. (1986), Fabry-Perot interferometers. Cambridge: Cambridge University Press.
  141. Fattinger, C., H. Koller, D. Schlatter, and P. Wehrli (1993), The difference interferometer: a highly sensitive probe for quantification of molecular surface concentration. *Biosens. Bioelectron.* **8**, 99-107.
  142. Lukosz, W. and C. Stamm (1991), Integrated optical difference interferometer as relative humidity sensor and differential refractometer. *Sensors Actuators* **25-27**, 185-188.
  143. Schlatter, D., R. Barnes, C. Fattinger, W. Huber, J. Hübscher, and J. Hurst (1993), The difference interferometer: application as a direct affinity sensor. *Biosens. Bioelectron.* **8**, 109-116.
  144. Heideman, R. G., R. P. Kooyman, and J. Greve (1994), Immunoreactivity of adsorbed anti-human chorionic gonadotropin studied with an optical waveguide interferometric sensor. *Biosens. Bioelectron.* **9**, 33-43.
  145. Nellen, P. M. and W. Lukosz (1991), Model experiments

- with integrated optical input grating couplers as biochemical sensors. *Sensors Actuators* **6**, 517-525.
146. Lucosz, W., P. Nellen, C. Stamm, and P. Weiss (1990), Output grating couplers on planar waveguides as integrated optical chemical sensors. *Sensors Actuators* **B1**, 585-588.
147. Cush, R., J. Cronin, W. Stewart, C. Maule, J. Molloy, and N. Goddard (1993), The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I. Principle of operation and associated instrumentation. *Biosens. Bioelectron.* **8**, 347-353.
148. Sethi, R. (1994), Transducer aspects of biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **9**. 243-264.
149. Koch, S., H. Wolf, C. Danapel, and K. A. Feller (2000), Optical flow-cell multichannel immunosensor for the detection of biological warfare agents. *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 779-784.
150. Schneider, B. H., E. L. Dickinson, M. D. Vach, J. V. Hoijer, and L. V. Howard (2000), Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum. *Biosensors & Bioelectronics* **15**, 13-22.
151. Schneider, B. H., E. L. Dickinson, M. D. Vach, J. V. Hoijer, and L. V. Howard (2000), Optical chip immunoassay for hCG in human whole blood. *Biosensors & Bioelectronics* **15**. 597-604.