

## 전기화학적 방법을 이용한 두 개의 오스뮴 고분자 막의 고정화 및 다중 검출 바이오센서에 관한 연구

태건식<sup>†</sup> · 김진구 · 최영봉 · 김혁한\*

단국대학교 첨단과학대학 화학과, <sup>†</sup>단국대학교 첨단과학대학 생명과학과

(2008년 8월 5일 접수 : 2008년 8월 20일 채택)

## The Electrochemical Studies of Two Osmium Redox Polymer Films and Their Application for Multi-Detecting Biosensor

Gun Sik Tae<sup>†</sup>, Jin-Gu Kim, Young-Bong Choi, and Hyug-Han Kim\*

Department of Chemistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

<sup>†</sup>Department of Biological Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received August 5, 2008 : Accepted August 20, 2008)

### 초 록

다중 생체시료 검출을 위한 바이오센서 연구를 위하여 각기 두 전위를 갖는 오스뮴 고분자를 함께 탄소 전극 (Screen Printed Carbon Electrodes) 위에 고정하였다. 새로운 개념의 다중 생체 시료 검출 바이오센서 연구위하여 과산화수소의 환원과 글루코스의 산화에 관여하는 환원 효소와 산화 효소를 각각 이용하였다. 실험 목적에 위하여 염소 작용기 ( $E^{O'} + 0.520$  vs. Ag/AgCl)와 메톡시 작용기 ( $E^{O'} + 0.150$  vs. Ag/AgCl)를 각각 포함하는 두 개의 오스뮴 고분자를 합성하였다. 전자는 과산화수소의 환원에 대하여 좋은 촉매전류신호를 보였고, 후자는 당의 산화에 대하여 효과적인 촉매전류신호를 보였다.

**Abstract :** Screen printed carbon electrodes (SPEs) modified with co-immobilized osmium-based redox polymers can be used to apply multi-detecting biosensors. In this study, we report our initial studies of multi-detecting biosensor concepts using two osmium-based redox polymers for horseradish peroxidase-mediated reduction of  $H_2O_2$  coupled to glucose oxidase-mediated oxidation of glucose. We target to synthesize two osmium redox polymers of potentials use, a chloride-containing redox polymer ( $E^{O'} + 0.520$  vs. Ag/AgCl) and a methoxy-containing redox polymer ( $E^{O'} + 0.150$  vs. Ag/AgCl). The former show good catalytic electrical signals with horseradish peroxidase and the latter's redox polymer is to be an effective redox mediator of glucose oxidation by glucose oxidase.

**Keywords :** Biosensor, Redox Polymer.

### 1. 서 론

바이오센서란 생체 시료를 선택적으로 감지하는 부분과 감지한 시료를 신호로 전환하는 부분으로 구성된 측정기기를 지칭한다. 생체감지부분 (Bioreactor)는 생

체 시료와 선택특이성에 의하여 반응하여 감지할 수 있는 항체, 항원, 효소, 렉틴, 기질, hormone-receptor 등이 쓰이고, 신호변환부분 (Signal Transducer)으로는 형광, 발색, 전기화학, SPR (surface plasmon resonance), FET (field-effect transistor), QCM (quartz crystal microbalance), 열 센서 등 다양한 물리화학적 방법을 사용하고 있다. 각각의 측정방법에 따라 장점과 단점을 갖고 있다. 여러

\*E-mail: hankim@dankook.ac.kr

측정 방법 중에서 전기화학 신호변환 방법은 직접 전기적 신호로 변환시켜준다는 점에서 저비용으로 소형화, 집적화의 편리성 때문에 상업적으로 가장 선호되는 방식의 한 가지이다.

전기화학적인 방법을 이용한 대표적인 바이오센서에가 효소전극(enzyme-linked electrode)이다. 효소란 특정한 생체기질만 선택적으로 결합, 반응을 유도하는 성질을 가지고 있으므로 효소를 전극 상에 고정하여 효소 반응에 의해 발생하는 산화/환원 반응을 직접적으로 전기화학 측정기기를 이용하여 검출할 수 있다. 최초로 상용화에 성공한 효소전극은 혈당센서(glucose sensor)이다. 혈당센서에 사용되는 효소인 당 산화효소(glucose oxidase)는 쉽고 값싸게 구할 수 있으며, 다른 효소보다 pH, 이온강도, 온도에 안정하며 또한 화학적인 고정화에 잘 견디고 상온에서 높은 회전율(turnover rate;  $\sim 10^3 \text{ s}^{-1}$ )을 갖는다는 이유 때문에 크게 상업적으로 성공했다고 볼 수 있다.

Clark와 Lyons에 의해 개발된 혈당센서는 당 산화 효소에 의하여 감소하는 산소의 농도변화를 측정하는 방법, 과산화수소의 농도를 측정하는 방법과 현재 상용화에 사용하는 산화·환원매개체(redox mediator)를 이용하는 방법 등이 있다.<sup>1-8)</sup> 산화·환원매개체(redox mediator)를 이용한 방법은 효소의 내부 혹은 외부에 위치하고 있는 활성 중심(active center)과 전극 사이 전자전달반응을 빠르게 진행하고, 선택하는 매개체의 전위에 따라 생체 내에 존재하여 방해물질로부터의 간섭을 피할 수 있어 높은 선택성(selectivity)과 감도(sensitivity)를 얻을 수 있다. 현재까지 많이 사용되는 산화·환원매개체(redox mediator)인 금속화합물들은 페로센(ferrocene), 페로센의 유도체, 퀴논, 퀴논의 유도체, 전도성 고분자인 폴리아닐린, 폴리피롤, potassium ferricyanide, tetrathiafulvalene(TTF)과 같은 전도성

염 등이 많은 연구가 진행되어 왔다. 또한 최근에는 8족 금속인 iron, ruthenium, osmium 착화합물에 관한 많은 연구가 진행되어지고 있다.<sup>8-13)</sup> 본 연구의 목표는 지금까지 진행되어 왔던 한 가지 생체시료를 검출하기 위한 바이오센서를 바탕으로 두 개의 다른 전위를 갖는 산화·환원매개체(redox mediator) 고분자를 함께 탄소 전극(Screen Printed Carbon Electrodes) 위에 고정화 하여 각각의 고분자가 다르게 생체시료에 감응하는 바이오센서 제작의 가능성을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 시약 및 시료

실험에 사용 된 Glucose oxidase (GOx), Horseradish peroxidase (HRP)는 Sigma사에서 Potassium hexachloroosmate(IV), 4,4'-dimethoxy-2,2'-dipyridyl, 1-(3-aminopropyl)-imidazole, sodium hydrosulfite (Aldrich Chem. Co.)에서 정제 없이 분석시약 급을 그대로 사용하였다. 1-Vinylimidazole (Aldrich)는 사용 전에 증류하여 Poly(1-vinylimidazole) (PVI)를 합성하였다.<sup>14)</sup> Polyacrylamide-poly (N-vinylpyridine) (PAA-PVP) 문헌에 보고된 방법을 따라 합성하여 정제하여 사용하였다.<sup>15)</sup> 합성물 정제를 위하여 TLC는 aluminum oxide (60 F<sub>254</sub>, 0.2 mm, Merck)판을 이용 하였으며, 관 크로마토그래피(column chromatography)에 이용된 aluminum oxide는 50~200  $\mu\text{m}$  (Acrose)를 사용하였다. 전해질로는 0.1 M NaCl을 포함한 PBS (pH 7.0, Phosphate Buffered Saline)를 사용하였고, 모든 용액의 제조와 실험을 위하여 3차 증류수 (저항 18 M $\Omega$ ·cm)와 용매는 Aldrich사에서 구입하여 분석시약 급을 그대로 사용하였다. 분석센서 스트립에 사용된 carbon paste (Electrodag 423SS)는 Acheson사 (Port Huron, MI)의 제품을 사용하였다.

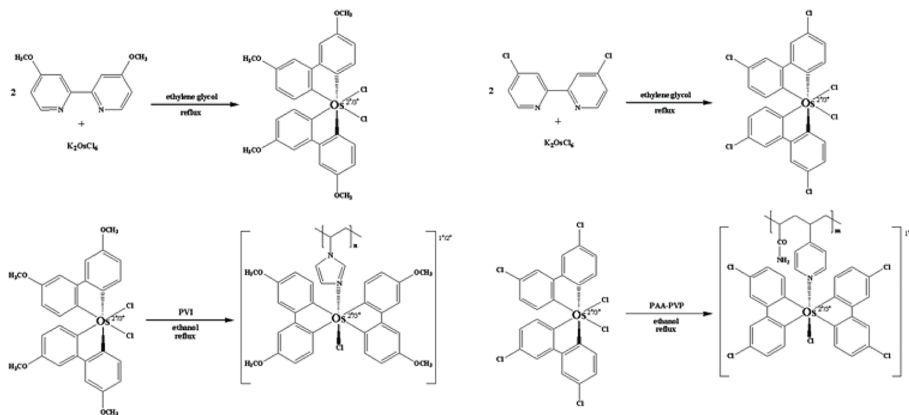


Fig. 1. The synthesis of PVI-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> and PAA-PVP-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>.

### 2-2. PVI-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2</sup>의 합성

Fig. 1과 같은 순서로 [Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]을 합성하기 위하여 100 mL 둥근바닥 플라스크에 202 mg의 potassium hexachloroosmate(IV)와 200 mg의 4,4'-dimethoxy-2,2'-dipyridyl을 7 mL의 ethylene glycol을 사용하여 녹인 후 환류냉각기에 플라스크를 연결하고, 1시간 동안 200°C에서 반응시켰다. 반응 후 1 M의 sodium hydrosulfite (10 ml)를 첨가하여 생성된 침전물을 0°C에서 30분가량 식혔다. 침전물을 Nylon membrane filter (Whatman, 0.45 m)을 이용하여 여과하고, 차가운 증류수와 에테르를 사용하여 세척하여 수득하였다.

합성된 100 [Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (100 mg)와 PVI (80 mg)을 50 mL의 에탄올에 녹여 100 mL 둥근바닥 플라스크 안에서 환류냉각기에 플라스크를 연결하고 3일 동안 반응을 시켰다. 반응 후 생성물을 50 mM NaCl과 10 mM HEPE가 포함된 ethanol/water (30 : 70 v/v) 전개용매로 Sephadex G-25 크기 배제 크로마토그래피로 정제하고 다시 용매를 회전증발기를 이용하여 증발시켜 얻었다.<sup>16)</sup>

### 2-2. PAA-PVP-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2</sup>의 합성

자료에 따라 4,4'-Dinitro-2,2'-bipyridine *N,N'*-dioxide는 합성하였다.<sup>12)</sup> 합성된 4,4'-Dinitro-2,2'-bipyridine *N,N'*-dioxide는 개량된 합성 방법을 따라 4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine (dCl-bpy)을 합성하였다.<sup>13)</sup> Fig. 1과 같이 [Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]을 합성하기 위하여 100 mL 둥근바닥 플라스크에 potassium hexachloroosmate (IV)와 4,4'-dichloro-2,2'-dipyridyl을 ethylene glycol (7 mL)에 1 : 2의 물 비로 녹여 넣은 후 환류냉각기에 플라스크를 연결하고, 1시간 동안 200°C에서 반응시켰

다. 반응 후 1 M의 sodium hydrosulfite (10 mL)를 첨가하여 생성된 침전물을 0°C에서 30분가량 식혔다. 침전물을 Nylon membrane filter (Whatman, 0.45 m)을 이용하여 여과하고, 차가운 증류수와 에테르를 사용하여 세척하여 수득하였다.

[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]와 polyacrylamidepoly (4-vinyl pyridine) (PAA-PVP)을 1 : 7의 물 비로 에탄올에 녹여 100 mL 둥근바닥 플라스크 안에서 환류냉각기에 플라스크를 연결하고 3일 동안 반응을 시켰다. 반응 후에 자료에 따라 정제하여 수득하였다.<sup>17)</sup>

### 2-3. 전극제조와 전기화학 측정

두 개의 오스뮴 고분자 막을 얻기 위하여 CHI 660B Electrochemical Workstation의 순환전압전류법을 이용하였다. 잘 세척된 지름 3 mm 탄소전극 위에 PBS 완충용액에 녹인 40 μL의 1 mg/mL PVI-Os-dmo-bpy 용액을 전극 위에 올리고 -0.4~0.8 V (vs. Ag/AgCl)를 10회 반복하여 순환전압전류법을 실행하였다. 실험 후에 탄소전극을 증류수로 여러 번 세척하고 말린 다음 PBS (40 μL)를 올리고 고분자 막의 고정화를 확인하였다. 다음 1 mg/mL PAA-PVP-Os-dCl-bpy 용액을 전극 위에 올리고 같은 방법으로 -0.4~0.8 V (vs. Ag/AgCl)를 10회 반복하여 순환전압전류법을 실행하였다. 세척과 건조 후에 PBS (40 μL)를 올리고 두 개의 오스뮴 고분자 막의 고정화를 확인하였다. 바이오센서 실험을 위하여 각각의 고정된 농도의 효소 (5 mg / in PBS 1 ml)에 기질 농도를 변화시키며 CHI 660B Electrochemical Workstation의 순환전압전류법과 전류/시간 법을 이용하여 산화/환원 촉매 전류를 확인하였다.

## 3. 결과 및 고찰

Fig. 2는 탄소전극 (screen printed carbon electrodes;

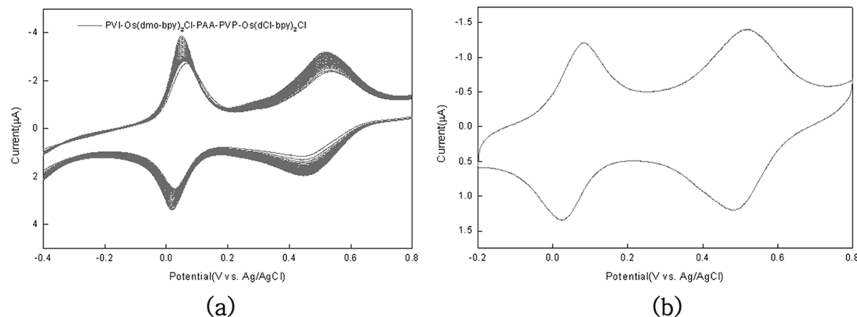


Fig. 2. (a) Repeated cyclic voltammograms of PVI-Os(dmo-bpy)<sub>2</sub>Cl and PAA-PVP-Os(dCl-bpy) with 0.14 M PBS. Scan rate at 100 mV/s. (b) The cyclic voltammogram of PVI-Os(dmo-bpy)<sub>2</sub>Cl and PAA-PVP-Os(dCl-bpy). Scan rate at 100 mV/s.

SPEs) 위에 순서대로 40  $\mu$ L의 1 mg/mL PVI-Os-dmo-bpy 용액을 전극 위에 올리고 -0.4~0.8 V (vs. Ag/AgCl)를 10회 반복과 세척 후에 1 mg/mL PAA-PVP-Os-dCl-bpy 용액을 같은 방법으로 -0.4~0.8V (vs. Ag/AgCl)를 10회 반복하여 잘 고정된 두 개의 명확한 오스뎀 고분자 막을 보여주고 있다. 비슷한 고분자를 갖는 두 전자 전달 매개체는 Fig. 2에서 보여주는 것과 같이 5배위인 PVI-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>의 산화환원 전위는 0.150 V (vs. Ag/AgCl)를 갖고 PAA-PVP-Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>는 산화환원 전위는 0.520 V (vs. Ag/AgCl)의 전위 값을 보여 준다. 낮은 산화환원 전위값을 갖는 PVI-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> 경우에 피리딘 리간드에 위치한 전자주개 작용기인 -OCH<sub>3</sub> 로 인하여 중심 금속인 Os의 산화환원전위를 수소가 위치한 리간드에 비교하여 약 200 mV 가량 음의 방향으로 이동시키고, 반면

에 PAA-PVP-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> 경우에 피리딘 리간드에 위치한 전자받개 작용기인 -Cl 로 인하여 중심 금속인 Os의 산화환원전위를 약 200 mV 가량 양의 방향으로 이동시켜 두 오스뎀 폴리머의 전위 차를 약 400 mV를 보여 준다. 산화 전하량과 환원 전하량 값들을 각각 적분하여 전극의 단위 면적당 고정된 오스뎀의 착화합물의 moles 수를 확인하였다. 계산된 값은 단위면적당 (surface coverage) moles 수는  $\Gamma_0 = \sim 5.05 \times 10^{-10}$  mole/cm<sup>2</sup> 값을 얻었다. 이러한 결과는 문헌에 발표된 매끈한 금 전극표면이 갖는 surface coverage는  $\Gamma_0 = 4.5 \times 10^{-11}$  mole/cm<sup>2</sup> 결과와 비교하여 본 실험에 사용한 스크린 프린팅 카본복합전극이 거친 표면으로 인하여 매끈한 표면을 갖는 전극보다 surface coverage가 많이 증가함을 확인 할 수 있었다. Fig. 3은 탄소전극 위에 고정된 두 폴리머 PVI-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>와 PAA-PVP-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-

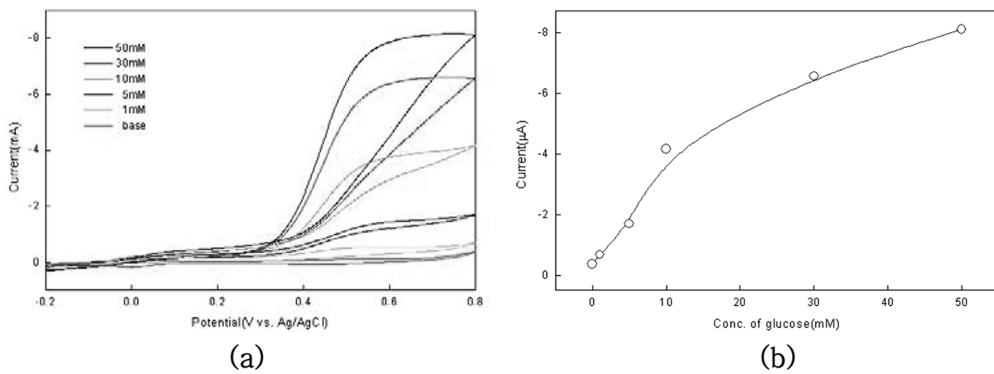


Fig. 3. (a) The catalytic anodic currents of glucose oxidation at the different concentration of glucose at SPEs modified by co-immobilized Os redox polymers with GOx. Scan rate at 5 mV/s. (b) Plots of the catalytic anodic currents at 0.8 V (vs. Ag/AgCl).

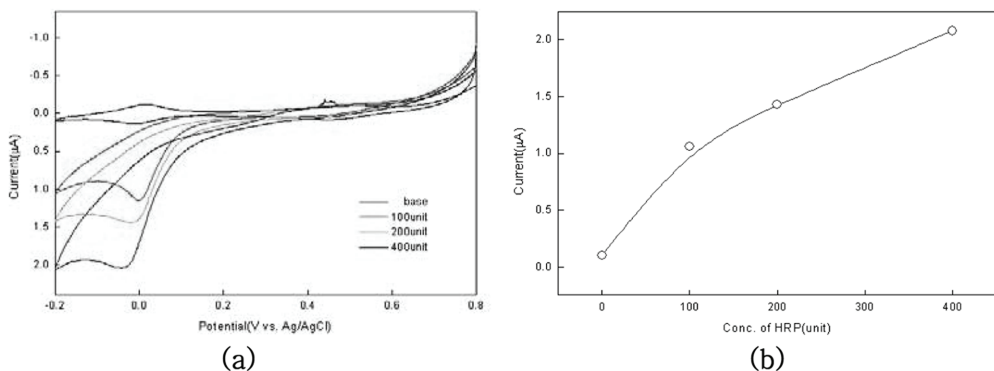


Fig. 4. (a) The catalytic cathodic currents of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction at the different units of HRP concentration at SPEs modified by co-immobilized Os redox polymers. Scan rate at 5 mV/s. (b) Plots of the catalytic cathodic currents at -0.2 V (vs. Ag/AgCl) with 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>에 당 (glucose)과 당 산화 효소 (GOx) (5 mg/ml in PBS)와 가한 후에 측정된 CV 그림이다. 당과 당 산화 효소 (GOx)의 촉매반응으로 발생하는 전자를 수용성 전자전달 매개체인 osmium polymer가 전자를 전극으로 전달할 때 발생하는 산화촉매전류를 순환전압전류법을 이용하여 여러 가지 다른 glucose농도 (0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 30 mM)별로 측정하였다. 두 개의 산화환원 매개체가 모두 전자 전달반응에 관여하지 않고 주로 높은 전위를 갖는 PAA-PVP-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>에 의한 산화촉매전류만이 나타남을 볼 수 있다. 촉매산화전류 값이 비교적 일정하게 유지되는 산화전위인 0.6 V (versus Ag/AgCl)에 전위를 고정하여 산화전류크기와 당 농도에 관련된 검정곡선을 도시하여 glucose의 농도별로 발생하는 당 산화촉매전류의 상관관계를 확인 하였다. glucose의 농도가 비교적 낮은 10 mM까지는 농도에 비례하여 일정한 전류의 양이 직선적으로 증가하는 것을 볼 수 있었고 10 mM 이상 일 때 전극 상에서 glucose가 산화되는 최대 값에 접근함에 따라, 즉 포화 (saturation)상태에 도달함에 따라 전류의 증가폭이 점차 작아지면서 한계촉매전류에 도달하는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 4은 탄소전극 위에 고정된 두 폴리머 PVI-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>와 PAA-PVP-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>에 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 과산화수소 환원 효소 (HRP) (5 mg/ml in PBS)와 가한 후에 측정된 CV 그림이다. 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 과산화수소 환원 효소 (HRP)의 촉매반응으로 osmium polymer가 전자를 전극으로부터 효소로 전달할 때 발생하는 환원촉매전류를 순환전압전류법을 이용하여 여러 가지 다른 HRP 농도 (0 unit, 100 unit, 200 unit, 300 unit, 400 unit)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>농도(그림 생략) 별로 측정하였다. 앞선 결과와 반대로 낮은 전위를 갖는 PVI-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>에 의한 환원촉매전류만이 나타남을 볼 수 있다. 같은 방법으로 촉매환원전류 값이 비교적 일정하게 유지되는 산화전위인 -0.1 V (versus Ag/AgCl)에 전위를 고정하여 환원전류크기와 HRP 농도에 관련된 검정곡선을 도시하여 HRP 농도별로 발생하는 과산화수소 환원촉매전류의 상관관계를 확인 하였다. HRP의 농도가 비교적 낮은 100 unit까지는 농도에 비례하여 일정한 환원전류의 양이 직선적으로 증가하는 것을 볼 수 있었고 100 unit 이상 일 때 전극 상에서 과산화수소가 환원되는 최대값에 접근함에 따라, 즉 포화 (saturation)상태에 도달함에 따라 전류의 증가폭이 점차 작아지면서 한계촉매전류에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 위의 두 결과로 부터 서로 다른 전위를 갖는 산화· 환원매개체는 촉매반응에 의하여 두 매개체가 산화형 또는 환원형의 농도가 sd중

가 될 때, 전극 상에 인접한 두 산화· 환원매개체 사이에서 빠른 내부 전자 전달반응으로 인하여 하나의 산화· 환원매개체만 촉매반응에 관여함을 볼 수 있었다. 결론적으로 본 연구를 통하여 서로 다른 두 전위를 갖는 전자전달매개체를 이용하여 동시에 여러 가지 생체시료를 측정 할 수 있는 다중 검출 바이오센서의 제작에 대한 가능성을 확인 할 수 있었다.

#### 4. 결 론

산화· 환원 전자전달매개체로 오스뮴을 중심 금속으로 두 PVI-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup>와 PAA-PVP-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>Cl]<sup>+2+</sup> 고분자를 합성하여 전기적 특성을 확인 할 수 있었다. 두 개의 각기 다른 전위를 갖는 전자전달 산화· 환원 매개체는 촉매전류의 방향에 따라 두 매개체 간의 빠른 내부 전자전달반응의 가능성을 예측할 수 있었다. 이러한 두 매개체의 내부전자전달 반응으로 인하여 다중의 생체시료를 측정 할 수 있는 바이오센서의 제작에 대한 가능성을 확인 할 수 있었다.

#### 감사의 글

본 연구는 단국대학교의 교내연구과제지원사업의 연구비 지원으로 인하여 이루어 졌기에 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. L. C. Clark Jr. and C. Lyons, 'Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery' *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
2. A. L. Crumbliss, H. A. O Hill, and D. J. Page, 'The electrochemistry of hexacyanoruthenate at carbon electrodes and the use of ruthenium compounds as mediators in the glucose/glucose oxidase system' *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **206**, 327 (1986).
3. M. A. Lange and J. Q. Chambers, 'Amperometric determination of glucose with a ferrocene-mediated glucose oxidase/polyacrylamide gel electrode' *Anal. Chim. Acta.*, **175**, 89 (1985).
4. D. A. Gough, J. Y. Lucisano, and P. H. S. Tse, 'Two-dimensional enzyme electrode sensor for glucose' *Anal. Chem.*, **57**, 2351 (1985).
5. A. P. F. Turner, 'Diabetes mellitus: biosensors for research and management' *World Biotech. Rep.*, **1**, 181 (1985).
6. K. McKenna and A. Brajter-Toth, 'Tetrathiofulvalene tetracyanoquinodimethane xanthine oxidase amperometric electrode for the determination of biological purines' *Anal. Chem.*, **59**, 954 (1987).
7. P. D. Hale and T. A. Skotheim, 'Cyclic voltammetry at

- TCNQ and TTF-TCNQ modified platinum electrodes: A study of the glucose oxidase/glucose and galactose oxidase/galactose systems' *Synth. Met.*, **28**, 853 (1989).
8. B. A. Gregg and A. Heller, 'Redox polymer films containing enzymes. 2. Glucose oxidase containing enzyme electrodes' *J. Phys. Chem.*, **95**, 5976 (1991).
  9. M. S. Vreeke, K. T. Yong, and A. Heller, 'A Thermostable Hydrogen Peroxide Sensor Based on "Wiring" of Soybean Peroxidase' *Anal. Chem.*, **67**, 4247 (1995).
  10. R. M. Ianiello, T. J. Lindsay, and A. M. Yacynych, 'Differential pulse voltammetric study of direct electron transfer in glucose oxidase chemically modified graphite electrodes' *Anal. Chem.* **54**, 1098 (1982).
  11. O. Miyawaki and L. B. Wingard, Jr., 'Electrochemical and enzymatic activity of flavin adenine dinucleotide and glucose oxidase immobilized by adsorption on carbon' *Biotech. Bioeng.* **26**, 1364 (1984).
  12. S. Anderson, E. C. Constable, K. R. Seddon, E. T. Turp, J. E. Baggott, and J. Pilling, 'Preparation and characterization of 2,2'-bipyridine-4,4'-disulphonic and-5-sulphonic acids and their ruthenium(II) complexes' *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2247 (1985).
  13. C. Taylor, G. Kenausis, I. Katakis, and A. Heller, "Wiring" of glucose oxidase within a hydrogel made with polyvinyl imidazole complexed with  $[(Os-4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)Cl]^{+2+}$ , *J. Electroanal. Chem.*, **396**, 511 (1995).
  14. G. Kenausis, C. Taylor, R. Rajagopalan, and A. Heller, "Wiring" of glucose oxidase and lactate oxidase within a hydrogel made with poly(vinyl pyridine) complexed with  $[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)_2Cl]^{+2+}$ , *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **92**, 4131 (1996).
  15. Y. Zhang, H-H. Kim, N. Mano, M. Dequaire, and A. Heller, 'Simple enzyme-amplified amperometric detection of a 38-base oligonucleotide at 20 pmol L-1 concentration in a 30-L droplet', *Anal Bioanal Chem.*, **374**, 1051 (2002).
  16. R. J. Forster and J. G. Vos, 'Synthesis, Characterization, and Properties of a Series of Osmium- and Ruthenium-Containing Metallopolymers' *Macromolecule*, **23**, 4372 (1990).
  17. Zakeeruddin, S. M.; D. M. Fraser, D. M.; Nazeeruddin, M.-K.; Gratzel, M. 'Towards mediator design: Characterization of tris-(4,4'-substituted-2,2'-bipyridine) complexes of iron(II), ruthenium(II) and osmium(II) as mediators for glucose oxidase of *Aspergillus niger* and other redox proteins' *J. Electroanal. Chem.* **337**, 253 (1992).