

전기화학적 면역센서의 식품적용과 미래

Electrochemical Immunosensors in Food Applications

채창훈*, 오세욱

Changhoon Chai, Se-Wook Oh

국민대학교식품영양학과

Department of Food and Nutrition, Kookmin University

I. 서론

면역센서의 개발과 발달은 안전한 식품을 효율적으로 생산할 수 있는 수단을 제공함으로써 식품안전 관리체계를 발전시켰으며 국민건강증진에 이바지하고 있다. 특히 면역센서는 생물학적 위해요소(식중독균 및 독소 등)를 비롯하여 화학적 위해요소(농약 등)에 적용할 수 있고 대상위해요소를 쉽고 짧은 시간 내에 분석할 수 있음에 따라 향후 식품안전 및 품질관리환경은 면역센서의 발전과 함께 진화할 것으로 판단된다. 면역센서는 전통적으로 광학적 기법을 기반으로 연구되고 개발되었으나, 최근 전기화학적 기법에 대한 관심이 증가되고 있다(1). 전기화학적 기법을 기반으로 하는 면역센서는 다른 형태의 면역센서에 비해 소형화가 가능하고 휴대용 통신기기와 결합이 용이하여 식품생산 및 유통 중 안전 및 위생 관리에 적용될 수 있는 바그 발전성이 높다(2). 본 논문은 면역센서에 사용될 수 있는 전기화학적 기법을 소개하고 현재 연구 방향을 탐색하여 전기화학적 면역센서의 미래를 전망하고자 한다.

1. 면역센서

면역센서(immunosensor)는 1985년 North에 의해 명명된 이래, 생명공학 및 전기·전자공학의 발전과 융합을 통해 비약적으로 발전하였다(3). 정의에 따르면 면역센서는 항원-항체반응을 기반으로 하는 바이오센서를 일컫는다(3, 4). Fig. 1에 도시된 바와 같이 면역센서는 면역인지인자(immunological recognition elements), 신호전환시스템(signal transducer)으로 구성되며(5), substrate는 면역인자와 신호전환시스템을

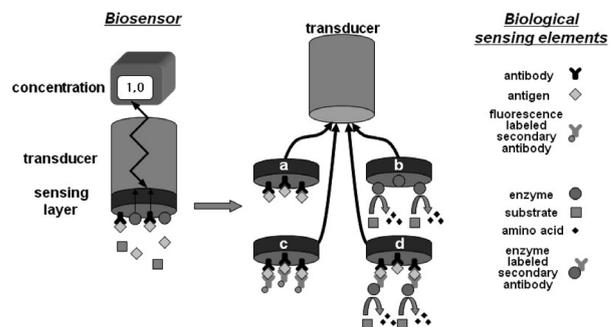


Fig.1. Structure of immunosensors. a: direct immunosensor, b: indirect immunosensor using fluorescence, c: indirect immunosensor using enzyme(5).

*Corresponding author: Changhoon Chai
 Department of Food and Nutrition, Kookmin University,
 Seoul 136-702, Korea
 TEL: +82-10-7320-7971
 FAX: +82-2-910-5249
 E-mail: changhoonchai@gmail.com

매개하는 역할을 수행한다(6). 면역인지인자로서 항원, 항체, 또는 생친화성(bio-affinity) 물질 등이 사용되며, 면역인지인과 대상물질간의 면역작용을 광학, 전기화학기법 등 신호전환시스템에 의해 신호로 전환되어 대상물질을 분석한다. 면역센서는 면역반응에 대한 표지과정의 유무에 따라 비표지면역센서(direct 면역센서) 또는 표지면역센서(indirect 면역센서)로 구분할 수 있다(Fig.1).

대중에게 가장 널리 알려진 면역센서는 lateral flow immunochromatographic assay를 응용하여 개발된 임신 진단키트로써 동일 방법이 식중독균 및 독소 검진에 응용되어 식품안전에 기여하고 있다(7,8). 또한 유기물 및 무기물 분석에 폭넓게 사용되어 생물학 및 생명과학의 발전에 큰 영향을 미친 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 역시 면역센서로 간주된다(9). Lateral flow immunochromatographic assay 및 ELISA와 같은 전통적 면역센서는 분석과정 중 면역반응을 측정하기 위한 표지과정(2차 면역반응 또는 효소 반응)을 요구하여 검진 및 분석에 상당한 시간이 소요된다. 이와 같이 면역센서는 전통적으로 광학적 기법을 기반으로 연구되고 개발되었다. 최근 infrared spectroscopy 및 raman spectroscopy 등 진화된 광학기법을 응용한 면역센서에 대한 연구가 활발하다(10,11). 광학적 기법 이외에 전기화학적, radioactive, surface plasmon resonance, mechanical(atomic force microscopic) 기법 등의 기법이 면역센서 및 바이오센서에 사용될 수 있으며(12-14), 분석의 신속성 및 편의성에 따라 최근 면역센서, 바이오센서는 비표지센서개발을 중심으로 연구되고 있다.

2. 전기화학적 면역센서

전기화학적 면역센서는 면역작용에 의해 발생하는 물리 화학적 특성을 전기화학적 기법을 응용하여 대상물질을 검진하는 바이오센서의 일종으로 면역 작용에 의해 나타나는 전기화학적 특성에 따라 voltammetry, potentiometry, 그리고 impedance spectrometry를 이용하여 대상물질을 검진한다. 비록 면역센서연구

와 개발은 광학적 기법을 중심으로 이루어졌으나, 최초로 상용화된 바이오센서는 전기화학적 기법을 기반으로 개발된 혈당 측정 바이오센서이다(15). 혈당 측정 바이오센서는 혈액 샘플의 glucose와 바이오센서 표면에 고정된 효소간의 생화학반응으로 발생되는 전기적 전위차를 측정하여 혈중 glucose를 정량한다(15). 하지만 전기화학적 바이오센서개발은 혈당 측정 biosensor 개발 이후 미진하였으며, 이는 glucose는 효소와 반응하여 전기화학적 활성을 나타내는 반면 식품 및 의학분야에서 분석이 요구되는 생화학물질의 상당수가 전기화학적 활성도가 낮음에 기인하는 것으로 판단된다. 그러나 최근 전기·전자공학, 표면과학, 나노공학 등의 발달과 더불어 전기화학적 활성도가 낮은 생화학물질 및 반응을 측정할 수 있는 전기화학적 기술이 소개되어 면역센서 엔지니어의 큰 관심을 불러 모으고 있다.

바이오센서 및 면역센서의 개념은 각각 Clark과 North에 의해 정립되었으며(3,15), 바이오센서는 1992년 IUPAC(International Union of Pure and Applied Chemistry)에 의해 정의된 바 있다(4). IUPAC에 의하면 바이오센서는 생화학적 반응을 전기, 열, 광학적 신호로 전달하여 대상물질을 분석하는 “device”로 정의된다(4). 협의적으로 바이오센서 및 면역센서의 정의를 해석할 경우, “device”의 정의에 따라 바이오센서 및 면역센서를 소형화, 단순화된 장치로 한정할 수 있다. 현재 바이오센서 및 면역센서를 IUPAC이 제시한 협의적 정의로 한정하는 것에 대한 논란이 존재하는 실정이다(16). 하지만 전기화학적 기법의 경우 전기·전자기법의 발달과 집적회로 개발에 따라 소형화가 용이하여 최근 MEMS(microelectromechanical systems)의 신호전환 기법으로 각광받고 있다.

II. 면역센서 적용을 위한 전기화학적 기법

I. Voltammetry

Voltammetry는 입력 전압에 대한 전류의 변화를 측정하는 전기화학적 기법으로(17), 최초로 상용화된

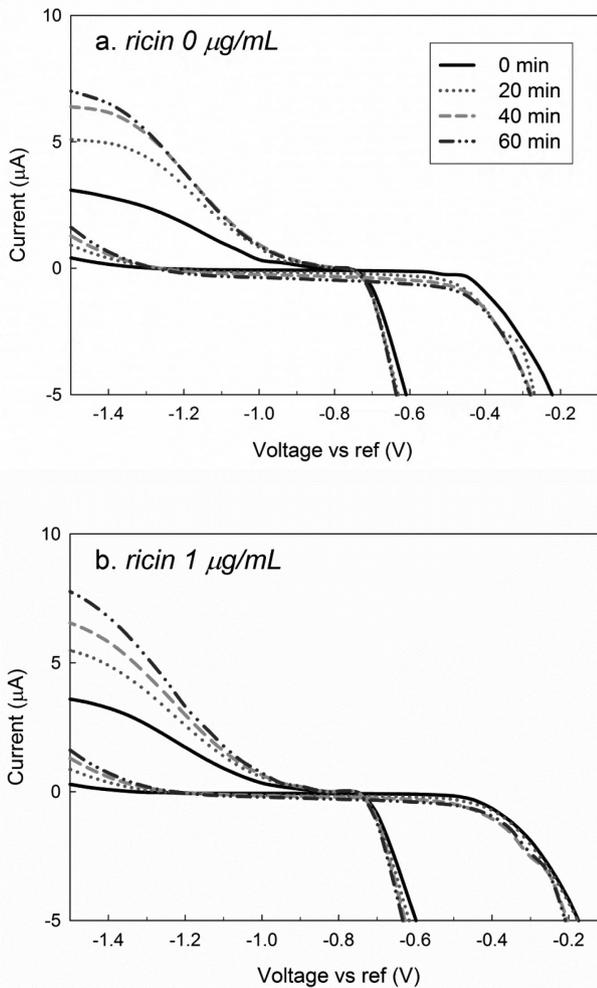


Fig.2. Cyclic voltammograms of anti-ricin immobilized aluminum substrate in a: ricin 0 $\mu\text{g/mL}$ and b: ricin 1 $\mu\text{g/mL}$ (21).

바이오센서인 혈당 측정 바이오센서의 신호전환시스템으로 사용되었다(15). 특히 voltammetry는 구조가 간단하고 개발이 저렴하여 바이오센서의 상용화에 기여한 바 크다. Voltammetry는 일반적으로 효소 반응성을 나타내는 물질의 검진 및 정량을 위한 바이오센서의 신호전환시스템으로 사용된다. 효소 작용의 부산물로서 생성된 이온은 전위차를 발생시키며, 전위차는 효소 반응과 비례적으로 나타남에 따라 분석 샘플에 존재하는 기질을 voltammetry를 이용하여 정량할 수 있다(15). Voltammetry를 기반의 바이오센서는

glucose 이외에 콜레스테롤(18), pyruvate, aniline (19), glutamine, 및 glutamate (20) 분석에 적용될 수 있다.

산화·환원 반응성을 나타내지 않는 항원-항체 반응을 voltammetry에 적용할 경우에도 항원-항체에 반응에 따라 voltammogram의 변화를 관찰할 수 있다 (Fig.2) (21). 비록 항원-항체반응은 산화·환원반응성이 없으나, 전극에 고정된 항체에 항원이 결합될 경우 전극표면의 전하 분포도 변화에 의해 전위차가 발생되어 voltammogram의 변화가 야기된 것으로 판단된다. 그러나 이 변화는 정량적이지 않음은 물론 항원-항체 특이적 변화와 환경적 요소에 의한 변화간 구분이 어려워 항원-항체반응과 같은 전기화학적으로 비활성물질의 검진에 적용에 큰 어려움을 나타낸다. 그러나 항원-항체결합체를 효소를 이용하여 표지할 경우 전기화학적으로 비활성인 물질을 voltammetry를 적용하여 정량할 수 있다(22).

2. Potentiometry

Potentiometric 면역센서는 전하가 거의 흐르지 않는, 즉 저항이 높은 조건에서 두 전극간의 전압차를 측정하여 전극표면의 항원-항체반응을 측정하는 전기화학적 기법이다. 대표적인 potentiometric 센서로서 pH 미터를 꼽을 수 있다(23). 전극간의 전압차이는 용액상의 이온의 양에 비례함에 따라(23, 24) 효소 반응에 의한 기질의 농도 분석 또는 효소가 표지된 항원-항체반응의 정량법에 potentiometry를 적용될 수 있다(25,26). 특히 센서의 sensitivity 향상을 위해 potentiometric 면역센서의 전극표면에 선택적 투과성 membrane을 종종 적용한다.

항원-항체반응은 항체가 고정된 전극표면이 샘플과 평형을 이룰 때까지 진행됨에 따라 전극표면의 전하분포는 항원-항체반응에 따라 변화한다. 전극표면의 전하분포 변화는 potentiometry를 이용하여 측정이 가능하며, 과거 potentiometry를 이용한 비표지면역센서개발에 대한 연구가 활발하였다(27,28). 그러나 potentiometric 면역센서는 표지과정이 생략되었을 경우 낮은 sensitivity를 나타내어 현재 potentiometry를 이

$$\dot{Z}(t, \omega) = \frac{E_0 \cos(t, \omega)}{I_0 \cos(t, \omega)} = Z_0 e^{j\theta} = Z_0 (\cos \theta + j \sin \theta) = Z'(t, \theta) + jZ''(t, \omega) \quad (\text{Eq. 1})$$

where Z_0 = a quantity of impedance, θ = phase angle, Z' = real part of impedance, and

Z'' = imaginary part of impedance.

용한 비표지면역센서에 대한 연구는 미미한 실정이다(17, 29). 분석 샘플에 존재하는 이온 및 기타 요소들의 간섭이 potentiometric 면역센서의 낮은 sensitivity의 이유로 판단된다(17).

3. Electrochemical impedance spectroscopy(EIS)

임피던스는 교류입력 신호에 대한 물질의 저항을 일컫는다. 직류 저항과 달리 파형의 교류입력 신호에 대한 물질의 저항을 나타내는 바 벡터로써 표현되며, 임피던스의 실수부(Z')는 저항으로 그리고 허수부(Z'')는 리액턴스로 정의된다(Eq. 1). EIS 분석 중 교류 입력신호의 파장을 변화시켜 파장에 따른 물질의 전기화학적 스펙트럼을 관찰할 수 있으며, 특이적 입력파장에 따른 물질의 특이적 전기적 특성을 이용하여 분석 대상에 존재하는 물질을 구분하여 측정할 수 있다. EIS 분석 결과로써 Z' , Z'' , phase angle 등 다양한 임피던스 요소를 획득할 수 있어(Fig.3) 분석 대상의 전기화학적 특성을 다양한 각도로 해석할 수 있다(30). EIS 기법은 전기·전자소자의 저항 특성(31), 페인트코팅의 표면 도포(32), 무기물 표면의 지형 특성(33), 콜로이드 형성 특성(34) 등에 관련 되어 산업적으로 적용되고 응용되고 있다.

EIS는 전극표면의 지형, 전극표면 이온 분포 등에 민감하게 반응하여 전극표면에서 발생하는 물리 화학적 변화의 관찰을 가능케 하며, 표면의 변화를 정량적으로 분석할 수 있음에 따라 면역센서 개발에 응용될 수 있다(35). 더불어 EIS는 전극표면의 물리화학적 변화를 분석 대상의 bulk quality와 구분하여 분석할 수 있어 면역센서에 적용할 경우 추가적인 표지과정 없이 전극표면의 항원-항체반응을 정량할 수 있는 것으로 알려져 있다(12, 36).

작업전극(working electrode), 상대전극(counter electrode) 이외에 기준전극(reference electrode)를 추가하여 EIS 분석에 사용될 수 있다(Fig.4). EIS 분석에서

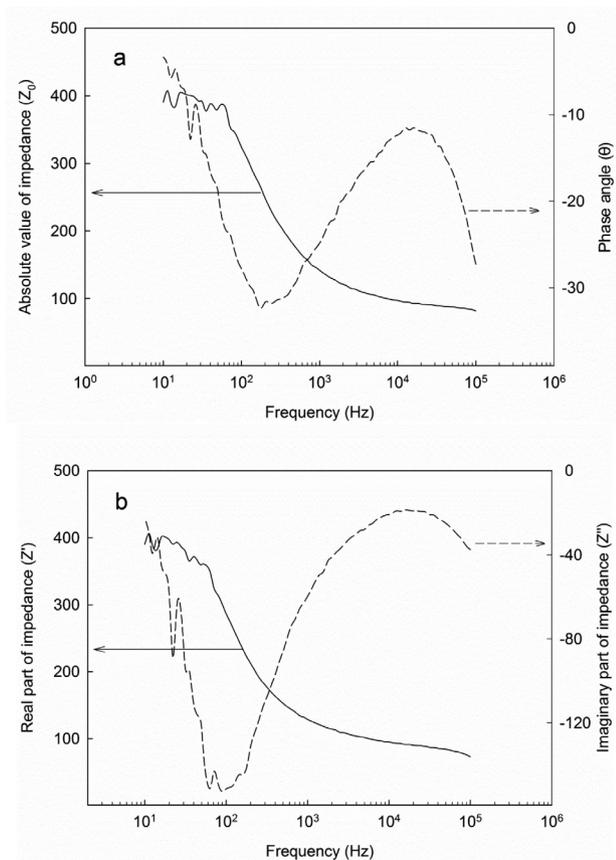


Fig.3. Typical spectra of a: absolute value of impedance (Z_0) and phase angle (θ), and b: real part of impedance (Z'), and imaginary part of impedance (Z'')(30).

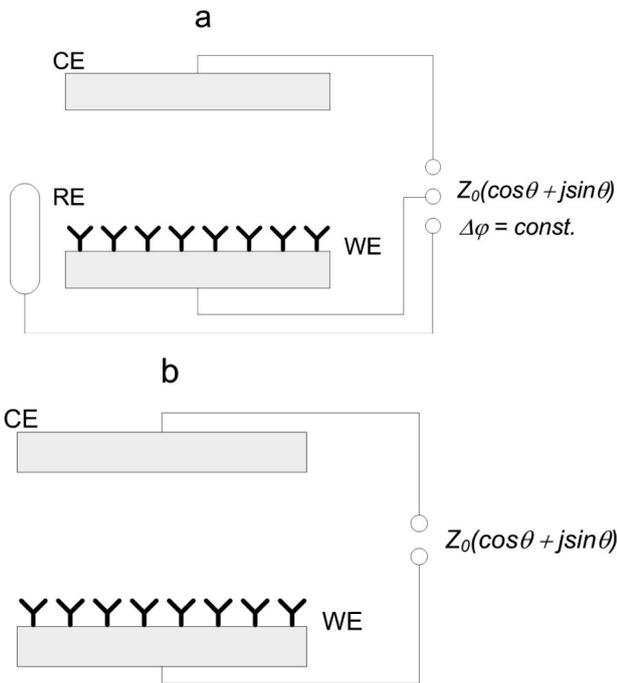


Fig.4. Schematic representation of modes of EIS analysis a: three-electrode mode and b: two-electrode mode (12).

작업전극과 상대전극을 이용할 경우 분석 대상의 dielectric 특성 분석을 수행할 수 있다. 그러나 작업전극이 기준전극을 이용하여 polarize 되었을 경우 작업전극표면의 전기화학적 특성을 구분하여 분석할 수 있다(12). 최근 작업 전극표면의 항원-항체반응을 분석하기 위한 EIS 적용은 일반적으로 작업전극, 상대전극, 기준전극을 모두 사용하는 추세이며, 기준전극에 의한 작업전극표면의 polarization을 통해 면역센서의 sensitivity를 향상시킬 수 있다(12).

EIS를 기반으로 하는 면역센서는 전기화학적 활성이 높은 생화학물질에서 항원, 항체, DNA등 전기화학적 활성도가 낮은 물질까지 다양한 물질의 분석에 이용될 수 있다(37). 항원-항체반응 및 효소반응의 전기화학적 특성에 따라 임피던스의 특이 요소의 변화를 관찰할 수 있다. 당단백질과 효소반응은 Z' 의 감소를(37) 그리고 항원-항체반응은 Z' 의 증가를 유기하는 것으로 보고되었다(12, 37). 앞서 언급한 바와 같이 면역센서의 전극표면에서 발생하는 항원-항체반

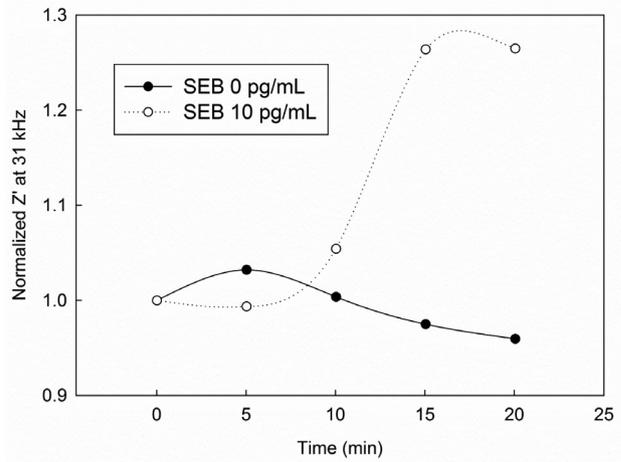


Fig.5. Normalized values of real part of impedance (Z') at a single frequency (31 kHz) obtained from EIS analysis of anti-SEB immobilized nanoporous aluminum substrate in SEB 0 pg/mL and SEB 10 pg/mL (12).

응은 평형 process를 따르는 바 EIS를 기반으로 하는 면역센서는 대상물질의 정량에 추가적 표지과정없이 사용될 수 있다(12, 21).

EIS는 교류 입력파장의 증가 또는 감소를 이용하여 대상물질을 선별하여 분석할 수 있다. 저 파장에서는 입력 전류에 대한 물질의 polaronic 전도가 그리고 고파장에서는 물질의 electronic 전도가 분석 대상 시스템의 전기화학적 특성을 결정짓는다(38). 보고된 바에 따르면 전극표면에서의 DNA간의 결합은 120 Hz의 임피던스를 특이적으로 증가하였으며 (36), anti-SEB(antibody for Staphylococcal enterotoxin B)와 SEB(Staphylococcal enterotoxin B)간의 결합은 31 kHz의 Z' 을 특이적으로 증가하였음을 확인할 수 있다 (Fig.5). 특히 EIS 기반의 면역센서의 sensitivity는 타면역센서에 비해 매우 민감하여 10 pg/mL미만의 대상물질을 20분 이내에 검진할 수 있는 것으로 보고되었다(12, 35). EIS 기반의 면역센서는 식중독균 및 기타 식품 유해물질 검진 및 검출에 적용될 수 있으며, 전기화학적 분석 기법 및 나노기술의 발달과 함께 앞으로 비약적으로 발전될 것으로 판단된다.

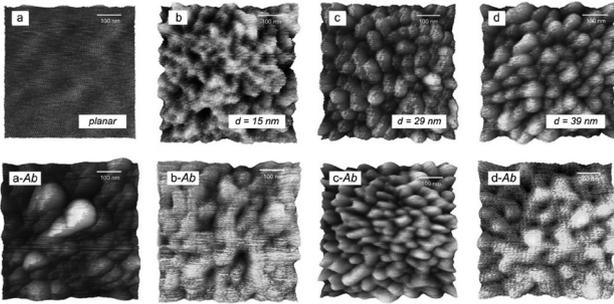


Fig.6. Surface morphology analysis based on SPM. The first row shows the surface morphology of a: a planar aluminum substrate, b: and c: nanoporous aluminum substrates developed by anodization at 20 and 40 V, and d: developed by anodization at 40 V with subsequent pore widening in 5% w/v phosphoric acid at 25 °C. The second row shows the surface morphology of Ab immobilization on planar (a-Ab), (b-Ab), (c-Ab) anodization at 20 and 40 V, and anodization at 40 V (d-Ab) with subsequent pore widening in acid at 25 °C (42).

4. 나노기술의 전기화학적 면역센서 적용

면역센서표면의 지형적 특성과 표면에 고정된 항체의 물리적 특성은 면역센서의 sensitivity와 reliability를 결정짓는 주요 요소이다. 특히 항체, 항원, DNA 등 면역센서의 면역인지 인자들은 나노크기를 나타냄에 따라 나노구조물을 면역센서에 적용할 경우 sensitivity 및 reliability 향상을 꾀할 수 있다.

탄소나노튜브(39), 실리콘 나노와이어(40), 금나노콜로이드(41), 나노다공성 알루미늄 및 실리콘(42) 등을 적용하여 sensitivity를 피코 수준으로 향상시킨 면역센서가 보고된 바 있다. 나노구조물 적용에 따른 면역센서의 sensitivity 향상은 과거 센서표면의 면적 증가에 의하는 것으로 추정되었으나(43), 최근 보고에 따르면 나노구조물 사용을 통한 면역센서의 sensitivity 향상은 면역센서의 표면적 증가보다 면역센서의 표면에서 면역인지 인자의 표면 배열 구조 향상에 기인하는 것으로 추정된다(42). 보고의 내용에서 주목할 만한 점은 면역인지 인자를 평면에 고정할 경우 면역인지 인자들 간의 물리적 반응에 따라 균일한 배열로 가공할 수 없다는 점이다(Fig.6). 나노다공성 표면에 면역인지 인자를 고정할 경우 면역센서의 표면에

면역인지 인자를 일정한 크기로 균일하게 분포할 수 있으며, 결과적으로 항원-항체반응의 효율성을 향상시켜 면역센서의 sensitivity를 향상시키는 것으로 판단된다(42). 따라서 향후 면역센서의 발전은 효율적인 나노물질의 개발과 적용과 함께 할 것으로 판단된다. 그러나 나노구조물의 경제성, 생산효율성, 적용확장성 등은 나노구조물을 기반으로 하는 면역센서 개발과 보급에 앞서 선결되어야 할 요소이다.

III. 식품산업에서 전기화학적 면역센서의 미래

식품 위생 및 안전은 식품의 생산에 한정되지 않고 식품의 저장, 운송, 진열, 판매, 소비 등 식품의 다양한 환경 노출과 환경의 유기적 작용에 의해 결정된다. 따라서 식품의 생산부터 소비까지 전 구간의 위생 및 안전이 이루어질 때 안전한 식품을 공급하고 소비할 수 있는 환경체계를 구축할 수 있다. 미래의 면역센서는 식품 생산, 유통, 소비 전 구간의 위생 및 안전을 모니터링할 수 있는 환경을 제공하여 궁극적인 식품 위생 및 안전을 달성할 것으로 판단된다. 특히 전기화학적 기법을 이용한 면역센서의 소형화, 간편화는 환경 구축의 밑거름이자 추진력이 될 것으로 전망된다. 전기화학적 기법, 나노기술, 집적회로 등의 발달에 따라 전기화학적 면역센서와 통신기기의 융합이 예상되며, 이는 식품의 생산, 유통, 판매, 소비 단계에서 식품 유해 요소를 유비쿼터스 분석을 가능하게 하여 국민 건강증진에 이바지할 것으로 예상된다. 또한 전자코, 전자 혀의 발달은 정량화 되기 어려운 식품품질관리 체계에 기준을 제공하여 균일한 품질의 식품 생산에 기여할 것으로 기대된다.

전기화학적 면역센서연구는 현재 피코그램 수준 미만의 펄토그램 수준까지 대상물질을 분석할 수 있는 기술적 기반을 제시하고 있다. 향후 전기화학적 면역센서연구는 소형화, 통신장비를 이용한 실시간 분석 및 데이터 전송에 초점이 맞추어질 것으로 예상된다. 그리고 단일 물질 분석을 뛰어넘어 다 물질 분석 면역센서 및 비전처리 면역센서에 대한 연구가 진행될 것으로 기대된다. 예를 들어, 산성 식품의 경우 항원과 항체가 일반적으로 중성 pH에서 반응함에 따라 면역센서 적용 전 pH 적정과 같은 전처리가 요구되나, EIS기법과 나노구조물, 센서표면의 화학적 특성 변형을 이용한 전기화학적 면역센서는 오렌지 주스와 같은 산성 식품에 존재하는 독소를 pH 적정없이 분석할 수 있다(21).

참고문헌

1. Turner, APF. 2013. Biosensors: Sense and Sensibility. *Chem Soc Rev* 42: 3184-3196.
2. Laurinavicius, V, Razumiene, J, Kurtinaitiene, B, Stankeviciute, J, Meskys, R. 2012. Reagentless and mediator-based electrochemical biosensors for food industry and medicine. In *Sensors*, 2012 IEEE.
3. North, JR. 1985. Immunosensors: Antibody-Based Biosensors. *Trends Biotechnol* 3: 180-186.
4. Nagel, H, Dellweg, B, Gierasch, LM. 1992. Glossary for Chemists of Terms used in Biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure and Applied Chemistry* 64: 143-268.
5. Leca-Bouvier, B, Blumatrice, LJ. 2005. Biosensors for Protein Detection: A Review. *Analytical Letters* 38: 1491.
6. Turner, APF. 1987. *Biosensors: Fundamentals and Applications*.
7. Davies, RJ, Eapen, SS, Carlisle, SJ. 2008. Lateral-flow immunochromatographic assays. In *Handbook of Biosensors and Biochips*. John Wiley & Sons, Ltd, .
8. Lopez-Campos, G, Martinez-Suarez, JV, Aguado-Urda, M, Lopez-Alonso, V. 2012. Detection, identification, and analysis of foodborne pathogens. In Springer US, p 13-32.
9. Moina, C, Ybarra, G. 2012. Fundamentals and applications of immunosensors, advances in immunoassay technology. In *Advances in Immunoassay Technology*. Chiu, NHL ed. InTech, p 65-80.
10. Baniukevic, J, Hakki Boyaci, I, Goktug Bozkurt, A, Tamer, U, Ramanavicius, A, Ramanaviciene, A. 2013. Magnetic Gold Nanoparticles in SERS-Based Sandwich Immunoassay for Antigen Detection by Well Oriented Antibodies. *Biosensors and Bioelectronics* 43: 281-288.
11. Wang, J, Han, H, Jiang, X, Huang, L, Chen, L, Li, N. 2012. Quantum Dot-Based Near-Infrared Electrochemiluminescent Immunosensor with Gold Nanoparticle-Graphene Nanosheet Hybrids and Silica Nanospheres Double-Assisted Signal Amplification. *Anal Chem* 84: 4893-4899.
12. Chai, C, Takhistov, P. 2010. Label-Free Toxin Detection by Means of Time-Resolved Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Sensors* 10: 655-669.
13. Fernández, F, Sánchez-Baeza, F, Marco, M-. 2012. Nanogold Probe Enhanced Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Improved Detection of Antibiotic Residues. *Biosensors and Bioelectronics* 34: 151-158.
14. Steffens, C, Leite, FL, Bueno, CC, Manzoli, A, Herrmann, PS. 2013. Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors. *Sensors* 12: 8278-8300.
15. Clark, LC, Lyons, C. 1962. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann N Y Acad Sci* 102: 29-45.

16. Thévenot, DR, Toth, K, Durst, RA, Wilson, GS. 2001. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 121-131.
17. D'Orazio, P. 2003. Biosensors in Clinical Chemistry. *Clinica Chimica Acta* 334: 41-69.
18. Gilmartin, MAT, Hart, JP. 1994. Fabrication and Characterization of a Screen-Printed, Disposable, Amperometric Cholesterol Biosensor. *Analyst* 119: 2331-2336.
19. Gilis, M, Durlat, H, Comtat, M. 1997. Amperometric Biosensors for -Alanine and Pyruvate Assays in Biological Fluids. *Analytica Chimica Acta* 355: 235-240.
20. Moser, I, Jobst, G, Urban, GA. 2002. Biosensor Arrays for Simultaneous Measurement of Glucose, Lactate, Glutamate, and Glutamine. *Biosensors and Bioelectronics* 17: 297-302.
21. Chai, C, Lee, J, Takhistov, P. 2010. Direct Detection of the Biological Toxin in Acidic Environment by Electrochemical Impedimetric Immunosensor. *Sensors* 10: 11414-11427.
22. Sharma, MK, Rao, VK, Agarwal, GS, Rai, GP, Gopalan, N, Prakash, S, Sharma, SK, Vijayaraghavan, R. 2008. Highly Sensitive Amperometric Immunosensor for Detection of Plasmodium Falciparum Histidine-Rich Protein 2 in Serum of Humans with Malaria: Comparison with a Commercial Kit. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 3759-3765.
23. Thevenot, DR, Toth, K, Durst, RA, Wilson, GS. 2001. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 121-131.
24. Buck, RP, Lindner, E. 1994. Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes. *Pure & Applied Chemistry* 66: 2527-2536.
25. Guilbault, GG. 1984. *Enzyme Electrode Probes*. Marcel-Dekker, New York. p 112-244.
26. Koncki, R, Hulanicki, A, Glab, S. 1997. Biochemical Modifications of Membrane Ion-Selective Sensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 16: 528-536.
27. Janata, J. 1975. An Immuno-electrode. *Journal of the American Chemical Society* 97: 2914-2916.
28. Thompson, M, Tauskela, JS, Krull, UJ. 1987. *On the Direct Immunochemical Potentiometric Signal*. Plenum Press, New York. p 1-18.
29. Aizawa, M, Kato, S, Suzuki, S. 1977. Immuno-responsive Membrane I. Membrane Potential Change Associated with an Immunochemical Reaction between Membrane-Bound Antigen and Free Antibody. *Journal of Membrane Science* 2: 125-132.
30. Chai, C. 2010. Label-Free Immunosensor for Toxin Detection in Food Matrix.
31. Tenno, A, Tenno, R, Suntuio, T. 2004. A Method for Battery Impedance Analysis. *Journal of The Electrochemical Society* 151: A806-A824.
32. Scully, JR. 1989. Electrochemical Impedance of Organic-Coated Steel: Correlation of Impedance Parameters with Long-Term Coating Deterioration. *Journal of The Electrochemical Society* 136: 979-990.
33. Macdonald, DD. 2006. Reflections on the History of Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Electrochim Acta* 51: 1376-1388.
34. Amin, M. 2006. Weight Loss, Polarization, Electrochemical Impedance Spectroscopy, SEM and EDX Studies of the Corrosion Inhibition of Copper in Aerated NaCl Solutions. *J Appl Electrochem* 36: 215-226.
35. Ouerghi, O, Touhami, A, Jaffrezic-Renault, N, Martelet, C, Ouada, HB, Cosnier, S. 2002. Impedimetric Immunosensor using Avidin-Biotin for Antibody Immobilization. *Bioelectrochemistry* 56: 131-133.
36. Gheorghe, M, Guiseppi-Elie, A. 2003. Electrical Frequency Dependent Characterization of DNA Hybridization. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 95-102.
37. Jie, M, Ming, CY, Jing, D, Cheng, LS, Huai na, L, Jun, F, Xiang, CY. 1999. An Electrochemical Impedance Immunoanalytical Method for Detecting Immunological Interaction of Human Mammary Tumor Associated Glycoprotein and its Monoclonal Antibody. *Electrochemistry Communications* 1: 425-428.
38. Geoffrey, L, Peter, P, Pankaj, V. 2001. Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Platform for Reagentless Bioaffinity Sensing. *Sensors and Actuation B* 78: 249-256.
39. Star, A, Gabriel, JP, Bradley, K, GrÅ½ner, G. 2003. Electronic Detection of Specific Protein Binding using Nanotube FET Devices. *Nano Lett* 3: 459-463.
40. Cui, Y, Wei, Q, Park, H, Lieber, CM. 2001. Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species. *Science* 293: 1289-1292.
41. Han, M, Gao, X, Su, JZ, Nie, S. 2001. Quantum-Dot-Tagged Microbeads for Multiplexed Optical Coding of Biomolecules. *Nature Biotechnology* 19: 631-635.
42. Chai, C, Takhistov, P. 2012. Control of the Lateral Interactions of Immobilized Proteins using Surface Nanoporous-Patterning. *Appl Surf Sci* 263: 104-110.
43. Jianrong, C, Yuqing, M, Nongyue, H, Xiaohua, W, Sijiao, L. 2004. Nanotechnology and Biosensors. *Biotechnology Advances* 22: 505-518.