

전기전도성 고분자 위에 고정된 aptamer에 흡착된 테트라브로뮤페놀프탈레인 에틸 에스테르를 이용한 트롬빈 검출

정새로미[†] · 노희복[†] · 심윤보^{*}

부산대학교 화학과

(2016년 9월 13일 접수 : 2016년 10월 16일 채택)

Thrombin Detection with Tetrabromophenolphthalein Ethyl Ester Adsorbed on Aptamer-attached Conductive Polymer

Saeromi Chung[†], Hui-Bog Noh[†], and Yoon-Bo Shim^{*}

Department of Chemistry, Pusan National University, Busan 46241, South Korea

(Received September 13, 2016 : Accepted October 16, 2016)

초 록

새로운 산화환원 표지자를 이용한 aptamer 기반의 전기화학적 트롬빈 검출 바이오 센서를 개발하였다. 1차 지방족 아민(primary aliphatic amine) 으로 개질한 aptamer를 전기 전도성 고분자 poly-(5,2':5',2"-terthiophene-3'-carboxylic acid) (polyTTCA) 층 위에 공유결합을 통해 고정하여 센서 표면을 개질하였다. Tetrabromophenolphthalein ethyl ester (KTBPE)를 aptamer와 상호 작용시켜 전기화학적인 산화환원 표지자로 사용하였다. aptamer로 개질한 층 위에 KTBPE의 산화반응을 differential pulse voltammetry (DPV)를 사용하여 조사하였으며, 최종 센서의 특성은 voltammetry, QCM, and ESCA 를 사용하여 조사하였다. KTBPE와 aptamer 센서와 반응 후, KTBPE의 산화 피크는 감소하였다. 센서의 선형 동적 범위는 10.0 ~ 100.0 nM 이었으며, 이때 검출 한계는 1.0 ± 0.2 nM이었다.

Abstract : An aptamer-based biosensor using a new redox indicator has been examined for the electrochemical detection of thrombin. The aptamer modified primary aliphatic amine was covalently immobilized onto poly-(5,2':5',2"-terthiophene-3'-carboxylic acid) (polyTTCA) layer. Tetrabromophenolphthalein ethyl ester (KTBPE) was interacted to aptamer and used as an electrochemical indicator. Prior to the detection, the oxidation reaction of KTBPE onto aptamer modified layer was also investigated using differential pulse voltammetry. The characterization of the final sensor (KTBPE/aptamer -polyTTCA) was performed by voltammetry, QCM, and ESCA. After binding of thrombin onto KTBPE/aptamer based sensor, the peak signal of KTBPE was gradually decreased. The sensor exhibited a dynamic range between 10.0 and 100.0 nM with the detection limit of 1.0 ± 0.2 nM.

Keywords : Conducting polymer, Aptamer, Tetrabromophenolphthalein ethyl ester, Thrombin, Electrochemical sensor

[†]Both authors contributed equally to this work.

^{*}E-mail: ybshim@pusan.ac.kr

1. 서 론

압타머 (aptamer)는 단백질, 펩타이드, 지질 등과 같은 분자 또는 크기가 작은 유기, 무기화합물 등 다양한 표적물질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 단일 가닥 핵산 (DNA 또는 RNA)을 말한다.¹⁾ 이러한 압타머는 항원-항체 반응과 같은 개념의 바이오센서 시스템에 도입이 가능하며, 인공적으로 합성하여 저렴하게 대량 생산 할 수 있다. 또한, 압타머 고정화 (immobilization) 기술은 단백질 고정화에 비해 비교적 간단하며 열 안정성, 정제의 용이성 등 여러 가지 장점을 가지고 있어 압타머를 이용한 새로운 친화성 감지 시스템 (affinity sensing system) 연구가 진행되고 있다.²⁻⁵⁾ 특히, 단백질뿐만 아니라 어떠한 종류의 표적 분자에 대해서도 압타머를 형성할 수 있기 때문에 항체 제작이 어려운 분자에 대한 인식체로 개발될 수 있다. 이러한 장점들을 바탕으로 압타머는 대체 항체로써 바이오센서 분야에서 주목 받고 있다.⁶⁻¹⁴⁾ 이 경우 단백질의 특정 도메인과 리간드가 결합하는 구조를 가질 수 있는 것처럼 압타머는 그에 상응하는 어떠한 종류의 표적 분자에도 특이적으로 결합할 수 있을 것이다. DNA 압타머는 표적물질과 결합 할 때 구아닌의 반복된 서열로 인해 안정된 구아닌 사중식형 구조 (guanine quadruplex structure)를 가지게 된다. 이는 일반적으로 선형구조 (unfold)형태였던 압타머가 4개의 구아닌 사이의 수소결합을 통해 입체구조 (fold)를 형성한 것이다.¹⁵⁻¹⁸⁾

트롬빈 (thrombin)은 섬유소의 형성 및 혈액 응고 기전에 중요한 역할을 한다. 혈액 응고인자를 활성화 시키고, 혈소판 응집 반응을 활성화시키므로, 트롬빈 형성에 문제가 생기면, 혈전 증가 같은 혈액응고 장애 질환에 걸리게 된다. 따라서, 인체 내에서 발생할 수 있는 비정상적인 혈액 응집 반응과 연관된 다양한 질병을 진단할 수 있는 주요한 바이오마커로 사용할 수 있으며, 항응고제 개발이나 바이오센서 분야에서 트롬빈을 검출하고 정량 분석하는 것이 중요하다.¹⁹⁾

이 연구에서는, 트롬빈과 압타머의 상호작용을 연구하기 위해 tetrabromophenolphthalein ethyl ester (KTBPE)를 산화/환원 표지자 (indicator) 로 사용하였다. KTBPE는 브로모페놀 블루 (bromophenol blue)의 계열로 단일 전하 염료 (singly charged dye)이며, 전기화학적, 광학적으로 활성을 가지는 물질이다. KTBPE는 1차, 2차, 3차 아민 (amine)과 방향족 3차 아민 (aromatic tertiary amine)과 결합하여 전하 이동 착물 (charge transfer complex)을 형성한다. 이러한 KTBPE의 성질을 이용하여 압타머에 반응시킨 후 시

차 펄스 전압전류법 (different pulse voltammetry, DPV)를 통해서 트롬빈을 정량하였다. 뿐만아니라, 센서 물질 고정 및 특성 확인을 광전자 분광기(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS), 수정 진동자 저울 (quartz crystal microbalance, QCM)을 통해서 수행하였다.

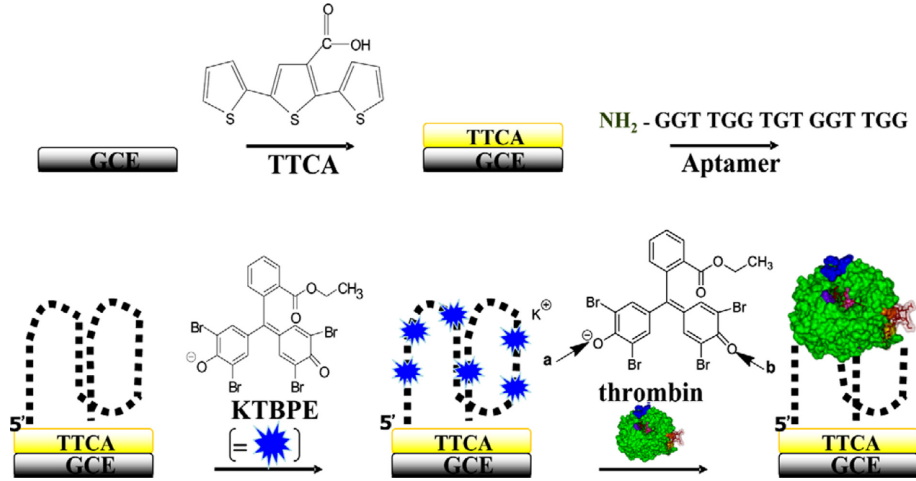
2. 실험 방법

2.1 시약

Trizma base (DNase and Protease-None detected), tetrabromophenolphthalein ethyl ester potassium salt (KTBPE), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDC), dichloromethane anhydrous (99.8%), tetra-*n*-butylammoniumperchlorate (TBAP)는 Sigma-Aldrich Co. (USA)로부터 구입하였다. 실험에 사용된 5,2':5',2"-terthiophene-3'-carboxylic acid (TTCA)은 자체 합성하였다.²⁰⁾ NH₂으로 변성화된 압타머는 Bioneer (Korea)로부터 구입하였고 염기서열은 NH₂-C₆-GGT TGG TGT GGT TGG (15 mer)이다. 트롬빈은 Haematologic Technologies Inc., 에서 구입하였다. 동결 건조된 압타머는 3차 증류수로 1 × 10⁻⁴ M의 농도로 녹인 후 냉동고에서 보관하고 매 실험마다 꺼내어 10.0 mM HEPES 완충 용액 (pH 7.4)에 1 × 10⁻⁵ M의 농도로 희석시켜 사용하였다. 트롬빈은 오염되는 것을 방지하기 위해 glycerol과 H₂O₂를 1:1의 부피 비로 넣어서 냉동 보관하고, 100.0 μM의 농도로 묽혀 실험에 사용하였다.

2.2 측정 장비

전기화학적 특성 분석을 위하여 전압전류법 (cyclic voltammetry, CV)과 시차 펄스 전압전류법 (DPV)은 Kosentech의 potentiostat/galvanostat model KST P-2 (South Korea)와 BAS CV-50W voltammetric analyzer (Bioanalytical Systems Inc., USA) 를 사용하였다. 모든 실험은 3전극계로써 유리질 탄소 (glassy carbon)을 작업 전극, Ag/AgCl (포화 KCl)을 기준 전극, 그리고 Pt 선을 상대 전극으로 각각 사용하였다. 전극 표면의 이미지와 성분 분석을 위한 XPS는 VG Scientific ESCALAB 250 그리고 QCM은 Zeiss FE-SEM Supra40 VP (ESCALAB 250, Germany) SEIKO EG&G model QCA 917 PAR model 263A potentiostat/galvanostat (USA) (금나노 입자가 코팅된 전극 (면적: 0.196 cm²; 9.0 MHz; AT-cut quartz crystal))를 이용하였다.



Scheme 1. Schematic representation for the sensor probe.

2.3 트롬빈 검출 센서 제작 및 전기화학적 측정 방법

유리질 탄소 전극을 1.0 mM의 TTCA 모노머 용액에 넣고 CV를 이용하여 0.0 에서 1.6 V까지의 전위 범위에서 100 mV/s의 주사속도로 1회 순환시켜 전기 중합 하였다. polyTTCA로 변성된 전극을 10.0 mM HEPES 버퍼 (pH 7.4)로 세척한 후 제조된 10.0 mM EDC 용액에 30°C에서 12시간 동안 담귀 반응시킨 후 1×10^{-5} M의 aptamer용액에서 2시간 동안 진탕 배양기 (shaking incubator)를 이용하여 120 rpm의 속도로 활성화시켜 고정화하였다. 소수성 물질인 1.0 mM KTBPE를 용매화하기 위해 에탄올과 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 용액을 1:1로 섞은 용액에 녹이고 40°C에서 30분간 sonication하였다. 0.20 μ m pore size의 필터를 이용하여 용액을 여과한다. 이렇게 제조된 용액에 aptamer로 변성된 전극을 넣고 30분간 상온에서 반응시킨다. KTBPE로 변성된 전극을 버퍼 용액으로 세척한 후 100.0 μ M의 트롬빈 용액에 전극을 담귀 상온 (25°C)에서 120 rpm 속도로 2시간 동안 반응 시켰다 (Scheme 1).

3. 결과 및 고찰

3.1 aptamer 변성 전극의 표면 특성 분석

XPS 분석을 이용하여 각각의 전극 변성과정에 따른 특정 작용기 (specific functional group)의 원소를 분석하였다. 먼저 유리질 탄소 디스크에 TTCA 폴리머를 형성한 후 카복실 산 그룹을 가진 TTCA polymer에 아민 그룹을 가진 aptamer를 2시간 동안 결합시켰다. 전극에 aptamer가 공유 결합으로 고정화된 것을 확인하기 위해서 XPS를 측정하였다. 그 결과

TTCA polymer에서 없었던 aptamer의 amine으로 인한 N1s peak을 400.0 eV 부근에서 확인 할 수 있었고 532.0 eV에서 aptamer의 염기로 인한 O1s의 피크 세기 (peak intensity)가 증가함을 알 수 있었다. Fig. 1 (A(a))의 N1s spectrum에서 399.18, 401.04 eV에 보여지는 두 개의 피크가 TTCA와 aptamer의 N-C-H 결합으로 인한 N-H, N-C 결합과 관계된 것임을 확인하였다. 그 결과 aptamer가 TTCA 폴리머 층에 잘 고정 되었음을 확인 할 수 있었다. Survey spectrum에서 69.09 eV부근의 Br3d 원소분석을 통해 aptamer에 KTBPE가 결합 하였음을 확인 하였다 (not shown). 더 자세한 분석을 위해 Fig. 1(A(b))의 O1s 스펙트럼을 분석한 결과 aptamer의 아민과 KTBPE의 OH가 N-H-O 결합을 형성하여 531.20 eV에서 O-H와 O-C 결합으로 인해 피크 세기가 증가 하는 결과를 나타내었다. 그 결과 aptamer의 아민기와 KTBPE의 OH 기가 공유 결합한 것을 확인 할 수 있었다.

Fig. 1(B(a))는 TTCA 폴리머 전극 위에 NH₂기를 가진 aptamer가 고정되는 양과 반응시간을 알아보기 위한 QCM 결과를 나타낸다. 미량 수정전극 (quartz crystal electrode)은 은(Ag)의 정전위적 석출에 관한 실험을 통해 보정하였고, 그 결과 미량 수정전극의 감도 계수 (sensitivity constant)는 5.608 (ng/cm²)/Hz 이었다. 미량 수정전극에 polyTTCA를 modification 시킨 후 1×10^{-5} M농도의 aptamer와 반응을 시켰다. Fig. 1(B(a))에서 보여지듯이 polyTTCA와 aptamer의 공유결합에 의해 1시간 동안 급격히 진동수(frequency)가 떨어지다가 70분 이후부터 거의 진동수의 변화가 없는 안정한 상태를 관찰 할 수 있었다. 총 진동수의 변화량은 602.0 Hz이고, 질량(mass) 변화량은 661.7 ng이다.

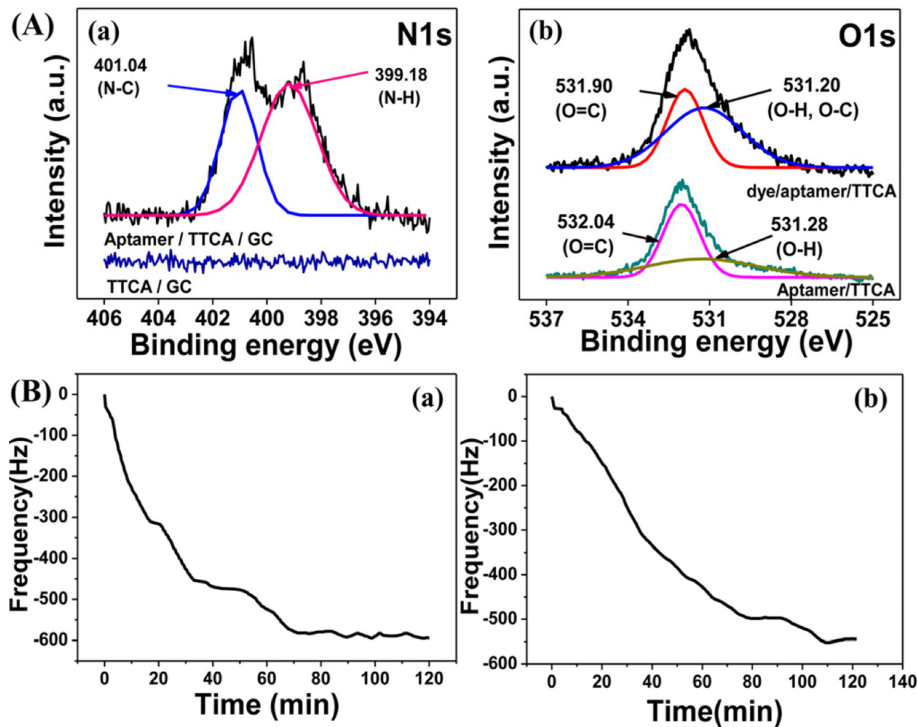


Fig. 1. (A) XPS spectra of (a) N1s and (b) O1s peaks for the TTCA, aptamer/TTCA, and Indicator/aptamer/TTCA layers. (B) QCM analysis (a) NH₂-aptamer is immobilized on TTCA/Au electrode [1×10^{-5} M aptamer in 0.1 M K⁺-Tris buffer (pH 7.4)] and (b) thrombin interacted on aptamer/ TTCA/Au electrode [thrombin: 100.0 nM in 0.1 M K⁺-Tris buffer (pH 7.4)].

Fig. 1(B(b))는 aptamer에 표적 단백질인 트롬빈이 결합하는 양과 반응시간을 알아보기 위한 QCM 측정 결과를 나타낸다. 70분까지 급격한 진동수 변화를 확인했고, 90분 이후로는 반응이 거의 끝나며 진동수의 변화가 거의 없는 것을 확인 하였다. 총 진동수의 변화량은 554.2 Hz이고, 질량 변화량은 608.93 ng 이다.

3.2 산화-환원 표지자의 전기화학적 특성

실험에 사용한 KTBPE는 전기화학적으로 활성을 가지는 표지자(indicator)이다. DPV를 이용하여 0.35에서 1.1 V까지 aptamer/TTCA/GC, KTBPE/aptamer/TTCA/GC와 thrombin/KTBPE/aptamer/TTCA/GC 전극을 각각 5 mV/s의 주사 속도로 측정하였다. Fig. 2(A(a))는 aptamer /TTCA/GC에서의 DPV 결과이다. aptamer는 15개의 염기서열로 구성되어 있으며, 염기 중 전기화학적으로 활성을 가지는 구아닌 (guanine)에 의해 950 mV에서 산화 피크를 확인 할 수 있었다. KTBPE와의 결합으로 인해 550, 760 mV에서 새로운 산화 피크를 관찰 하였다 (inset Fig. 2(A)). 이는 KTBPE의 산화 피크를 통해 aptamer가 KTBPE와 결합

한 것을 나타낸다. 유리질 탄소 전극을 이용하여 KTBPE의 산화 피크를 확인했을 때 550과 760 mV에서 두 개의 뚜렷한 피크를 확인할 수 있었으나, aptamer에 결합시킨 KTBPE는 활성 자리 (active site)에 영향을 받아 550 mV에서 KTBPE의 피크가 작아짐을 볼 수 있다. KTBPE/aptamer/TTCA/GC 전극에 표적 단백질인 트롬빈을 반응 시킨 결과, KTBPE의 산화 피크가 감소하였다 (Fig. 2(A(c))). 그 결과, KTBPE를 이용하여 전기화학적으로 트롬빈을 검출 할 수 있다고 증명할 수 있었다.

실험에 사용한 aptamer는 2개의 사중 구조(quartet)가 쌓여있고(stacking), 의자모양으로 접혀있는 구조를 가진다. DNA는 구조 변화에 따라 활성을 잃게 되고 안정성이 떨어지게 되므로, 생체내의 반응을 연구하는데 있어서 DNA의 입체 (folding)-선형 (unfolding) 구조의 형태 변환은 중요한 요소이다. aptamer의 층상구조는 트롬빈의 존재유무와 온도 그리고 특정 금속 이온의 존재에 따라 수소결합이 깨어지고 구조적 변화가 발생한다는 사실이 NMR^{21,22}와 XRD^{23,24} 분석을 통해서 보고되었다. 특이하게 트롬빈 aptamer는 K⁺ 과

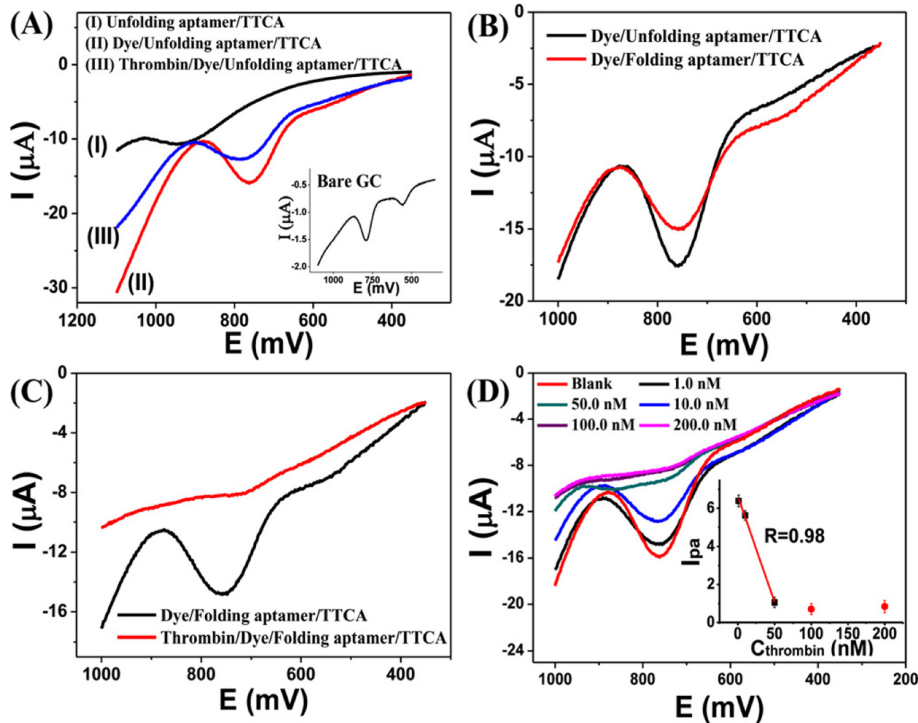


Fig. 2. DPVs at (A) different modified layers ((I) aptamer, (II) KTBPE(indicator), (III) after thrombin detection, and bare GC). (B) different conformational aptamer, (C) dye without thrombin and with thrombin interaction (folding aptamer), and (D) indicator at different concentration of thrombin (inset: calibration plot: I_{pa} versus concentration of thrombin).

Na^+ 같은 1가 양이온의 금속 이온이 존재할 때 안정한 입체 (folding) 구조를 가지게 되는데 금속 이온의 크기, 전하 그리고 수화성이 구조의 안정성에 영향을 준다.²⁵⁾ 상온에서 압타머는 1가 금속 이온 중에서 K^+ 와 Rb^+ 와 강하게 복합체를 형성하며, Na^+ 과 Cs^+ 과는 안정된 구조를 형성하지 못한다.

압타머의 성질을 이용하여 KTBPE와 압타머의 선형-입체 구조의 변화에 따른 상호작용의 차이를 DPV로 비교해 보았다. Fig. 2(B)의 결과, 선형 구조 (unfolding structure)를 가질 때 압타머와 KTBPE가 더 강하게 결합하는 것을 보인다. 의자 모양으로 접힌 입체적 구조의 압타머는 풀린 구조에 비해 KTBPE와의 결합이 작은 것으로 생각된다.

Fig. 2(C)는 선형-입체 구조의 압타머에 각각 KTBPE를 결합시킨 전극을 이용하여 트롬빈을 검출할 때의 차이를 알아 보았다. 그 결과 선형 구조의 압타머는 트롬빈과의 상호작용으로 인해 KTBPE의 산화 피크의 차이가 크게 나타났다.

Fig. 2(D)는 KTBPE/aptamer/TTCA/GC 전극을 사용하여 트롬빈의 다양한 농도 (1.0, 10.0, 50.0,

100.0, 200.0 nM)에 따른 KTBPE의 산화 전류값 변화를 나타내는 DPV 결과이고, inset Fig. 2(D)는 검정 곡선을 나타낸다. 이 결과 트롬빈의 농도 범위가 1.0에서 50.0 nM 일 때 직선성을 보였으며, 100.0 nM 보다 농도가 높을 경우 산화 전류값의 변화가 없는 것을 확인하였다. 센서의 선형 동적 범위는 10.0에서 100.0 nM이며, 검출 한계는 1.0 ± 0.2 nM이다.

3.3 산화환원 표지자의 pH에 따른 전기화학적 특성

KTBPE는 1차, 2차, 3차 알킬아민과 결합하여 복합체를 형성하는 물질로 알려져 있으며 pH 표지자로 사용되고 있다. KTBPE는 압타머의 구조적 변화에 따라 다른 특징을 보이는데, 압타머가 선형 구조일 때 더 강하게 결합하는 특징을 보인다. 압타머가 입체구조일 때 입체장애로 인해 KTBPE가 표지자로 작용하는데 방향을 받는 것으로 생각된다. 그 결과 표지자를 이용하여 압타머의 구조 차이를 전기화학적으로 알아 볼 수 있다. KTBPE의 pH에 따른 전기화학적 특성을 분석하기 위해 유리질 탄소 전극을 이용하여 1.0 mM의 KTBPE 용액에서 DPV를 측정하였다. pH가 작아질수록

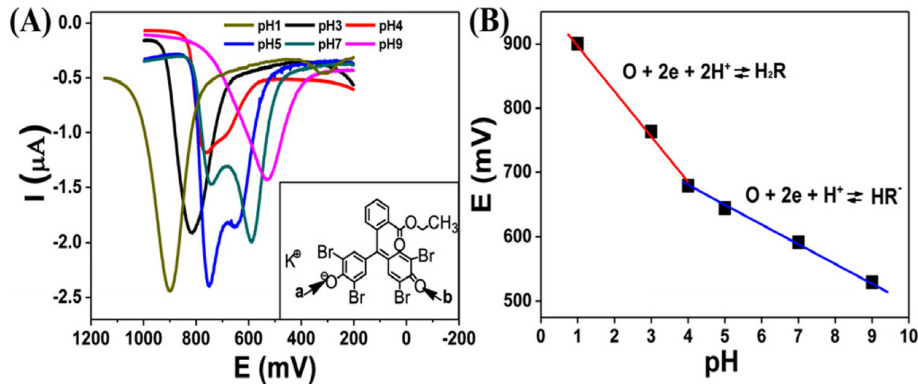


Fig. 3. (A) DPVs of 1.0 mM KTBPE in each pH buffer solution. (B) The plots of pH versus peak potential for 1.0 mM KTBPE solution.

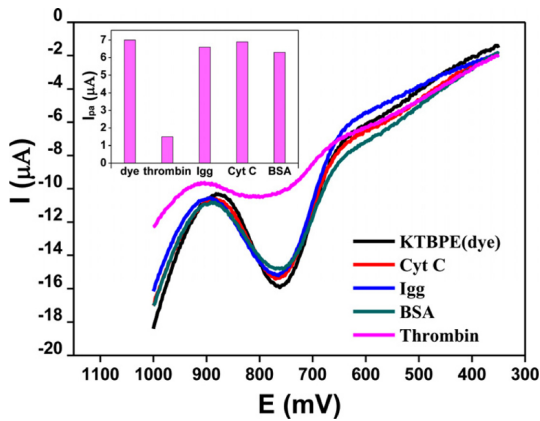


Fig. 4. DPVs of indicator at the different protein electrodes: indicator, thrombin, Igg, Cyt C, and BSA.

록 더 양(positive)의 전위값을 가지는 것을 알 수 있었다. pH 3에서는 하나의 넓은 산화 피크를 보였고 pH 4에서부터 산화 피크의 갈라짐이 보였다. 그리고 다시 pH 9에서 하나의 넓은 산화 피크만을 관찰 할 수 있었다.

Fig. 3(A)의 결과를 바탕으로 pH에 따른 피크 전위 (peak potential) 값을 구하여 그래프화 하였다. Fig. 3(B)의 E-pH 그래프를 보면 pH가 증가할수록 전위값이 감소하는 형태를 보인다. Nernst 식을 이용하여 dE^0/dpH 값을 구한 결과 낮은 pH 범위에서의 $dE^0/dpH = 60.48 \text{ mV/pH}$ 의 값으로부터 $1 \leq pH \leq 4$ 의 범위에서는 두개의 전자와 두 개의 양성자가 관여하는 반응임을 알 수 있었다. 반면, $4 \leq pH \leq 9$ 의 범위에서는 1개의 양성자와 2개의 전자전달 반응을 한다는 것을 알 수 있었다. 이 결과로부터 KTBPE는 산성의 조건에서 양성자 첨가(protonation) 반응이 일어나며, inset

Fig. 3(A)의 구조에서 볼 수 있듯이 칼륨(potassium)이 결합하고 있던 a 지점과 conjugation된 b 지점이 반응에 관여하는 것으로 생각된다. pH 3이하 에서는 두 개의 활성 자리가 강하게 conjugation되어 하나의 피크로 보이고 pH 4이상에서는 두 개로 갈라진 피크를 관찰 할 수 있었다.

3.4 방해 작용 검토

KTBPE가 결합된 센서의 선택성 (selectivity)을 측정하기 위해 20.0 nM의 트롬빈과 1.0 mg/mL 농도의 면역글로블린G(IgG), 시토크롬 C(Cytochrome C; Cyt C), 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin; BSA) 과 반응시킨 전극을 각각 비교 하였다. Fig. 4의 결과, 다른 단백질과는 피크 전류의 차이가 거의 없음을 통해 압타머와 트롬빈의 선택적인 결합을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구는 카르복실 산 그룹을 가진 단량체TTCA를 전기화학적 방법을 이용하여 전기 중합하여 합성된 polyTTCA와 아민 그룹을 가지는 압타머를 변성 전극으로 사용하여 트롬빈의 검출 센서를 성공적으로 개발하였다. 활성을 가지고 있지 않는 트롬빈과의 상호 작용을 전기화학적으로 검출하기 위해 KTBPE를 산화/환원 표지자로 사용였다. QCM을 이용하여 TTCA로 변성된 전극에 압타머가 결합한 양을 정량 분석하였고, XPS 분석을 통해 펩타이드 결합으로 인한 N-H, N-C 결합을 확인하였다. 트롬빈의 검출의 선형 동적 범위는 1.0 nM에서 100.0 nM이며, 검출 한계는 $1.0 \pm 0.2 \text{ nM}$ 이다. DNA 염기의 산화과정을 직접 관찰하기 위해 DPV를 이용하여 트롬빈 결합 전후의 압타머 산화 피크를 비교 하였다. 그 결과, 표지자인

KTBPPE를 이용하여 트롬빈을 검출한 것이 직접적인 압타머의 구아닌 산화반응을 이용한 결과보다 선택성이 높은 것을 확인하였다.

감사의 글

“이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년 과제)에 의하여 연구되었음.”

References

1. C. Tuerk and L. Gold, *Science*, **249**, 505-510 (1990).
2. A. D. Ellington and J. W. Szostak, *Nature*, **346**, 818-822 (1990).
3. A.-E. Radi, J. L. A. Sanchez, E. Baldrich, and C. K. O'Sullivan, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 117 (2006).
4. J. A. Hansen, J. Wang, A.-N. Kawde, Y. Xiang, K. V. Gothelf, and G. Collins, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2228 (2006).
5. A.-E. Radi, J. L. A. Sanchez, E. Baldrich, and C. K. O'Sullivan, *Anal. Chem.*, **77**, 6320 (2005).
6. M. Liss, B. Petersen, H. Wolf, and E. Prohaska, *Anal. Chem.*, **56**, 95-97 (2002).
7. C. K. O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**, 44-48 (2002).
8. F. W. Scheller, U. Wollenberg, A. Warsinke, and F. Lisdat, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **249**, 505-510 (1990).
9. S. Tombelli, M. Minunni, E. Luzi, and M. Mascini, *Bioelectrochemistry*, **67**, 135-141 (2005).
10. S. Klug and M. Famulok, *Mol. Biol. Reports*, **20**, 97-107 (1994).
11. K. Min, M. Cho, S.-Y. Han, Y.-B. Shim, J. Ku, and C. Ban, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 1819-1824 (2008).
12. Y. Zhu, P. Chandra, K.-M. Song, C. Ban, and Y.-B. Shim, *Biosens. Bioelectron.*, **36**, 29-34 (2012).
13. T. A. Mir, J.-H. Yoon, N. G. Gurudatt, M.-S. Won, and Y.-B. Shim, *Biosens. Bioelectron.*, **74**, 594-600 (2015).
14. P. Chandra, H.-B. Noh, M.-S. Won, and Y.-B. Shim, *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 4442-4449 (2011).
15. T. Hianik, V. Ostatna, M. Sonlajtnerova, and I. Grman, *Bioelectrochemistry*, **70**, 127-133 (2007).
16. C. M. Olsen, W. H. Gmeiner, and L. A. Marky, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 6962-6969 (2006).
17. X. Mao and W. H. Gmeiner, *Biophys. Chem.*, **113**, 155-160 (2005).
18. I. Smirnov and R. H. Shafer, *Biochemistry*, **39**, 1462-1468 (2000).
19. Md. A. Rahman, J. I. Son, M.-S. Won, and Y.-B. Shim, *Anal. Chem.*, **81**, 6604-6611 (2009).
20. T.-Y. Lee, S.-C. Shin, and Y.-B. Shim, *Synth. Met.*, **126**, 105-110 (2002).
21. N.-H. Kwon, Md. A. Rahman, M.-S. Won, and Y.-B. Shim, *Anal. Chem.*, **78**, 52-60 (2006).
22. H. Cai, T. M.-H. Lee, and I.-M. Hsing, *Sens. Actuator B-Chem.*, **114**, 433-437 (2006).
23. G. S. Bang, S. Cho, and B.-G. Kim, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 863-870 (2005).
24. T. Hianik, V. Ostatna, Z. Zajacova, E. Stoikova, and G. Evtugyn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 291-295 (2005).
25. I. Koper, *Mol. Biosyst.*, **3**, 651-657 (2007).