

## 나노바이오촉매 기반 효소결합면역흡착검사

이인선 · 황상연 · 김종배<sup>†</sup>

고려대학교 화공생명공학과  
130-701 서울시 성북구 안암동 5가  
(2010년 12월 3일 접수, 2011년 1월 10일 채택)

### Nanobiocatalyst-Linked Immunosorbent Assay(NBC-LISA)

Inseon Lee, Sang Youn Hwang and Jungbae Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, 5-ga, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-713, Korea  
(Received 3 December 2010; accepted 10 January 2011)

#### 요 약

생촉매인 효소의 기질선택성은 다양한 분야에서 유용하게 이용되고 있다. 그 중에서도 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)는 항원항체의 결합을 항체와 공유결합된 효소의 반응으로 나타냄으로써 다양한 항원들의 진단을 가능케 했다. 하지만 기존의 효소결합면역흡착검사는 하나의 항체당 하나의 효소가 결합된 형태이기 때문에 감도(sensitivity)의 증가 폭에 그 한계가 있으며, 이를 극복하기 위한 방안으로 하나의 항체당 결합된 효소의 수를 증가시킴으로써 혁신적인 감도의 향상을 가져오는 연구가 진행되었다. 최근 나노바이오촉매(nanobiocatalyst, NBC) 접근방식을 이용한 효소활성의 안정화는 효소결합면역흡착검사의 감도 향상뿐만 아니라 그 성능의 안정성을 확보할 수 있는 연구결과로 이어지고 있다. 본 총설에서는 일반적인 효소결합면역흡착검사의 기본적인 원리와 감도향상을 위한 연구, 그리고 성능안정성(performance stability)을 향상시키기 위한 나노바이오촉매-결합면역흡착검사(Nanobiocatalyst-Linked Immunosorbent Assay, NBC-LISA)에 대하여 살펴보고자 한다.

**Abstract** – Enzymes are being used in various fields due to their unique property of substrate specificity. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) has enabled the detection of various antigens by reporting the binding event of antigen and antibody via enzyme-catalyzed reaction. However, the sensitivity improvement of conventional ELISA has been limited because only one enzyme molecule is conjugated to one molecule of antibody. To overcome this limitation and further improve the sensitivity of ELISA, there have been efforts to increase the number ratio of enzymes to antibody. Recently, the nanobiocatalytic approaches, with their successful enzyme stabilization, improved the performance stability as well as sensitivity in a modified protocol of ELISA. The present paper introduces the basic principle of ELISA, and the recent efforts to improve sensitivity and performance stability of ELISA by using the nanobiocatalytic approaches.

Key words: Immunoassay, Nanobiocatalyst, Stability, Sensitivity, Nanobiocatalyst-linked Immunosorbent Assay(NBC-LISA)

#### 1. 서 론

효소는 생명체내의 화학반응을 촉진하는 생촉매로서, 효소의 기질선택성은 화학변환(chemical conversion)[1], 생물정화(bioremediation)[2], 바이오센서(biosensor)[3] 등과 같은 다양한 분야에서 이용되고 있다. 특히 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)는 효소가 의료 분야에 응용된 대표적인 사례라 할 수 있다. 효소결합면역흡착검사는 효소를 항체에 결합시킴으로써 항원과 항체의 면역반응을 효소의 활성을 통하여 분석할 수 있는 검사방법이다. 효소결합면역검사는 체내의 병원균 및 바이러스를 특이적으로

검사할 수 있는 장점 때문에 현재 다양한 분야에서 활용되고 있다. Frost & Sullivan의 “Strategic Analysis of the Global In Vitro Diagnostics Market” 보고서에 따르면, 전 세계 체외 진단(in vitro diagnostics, IVD) 시장은 2009년 기준 387억 달러 규모로 평가되었다. 이 당시 ELISA를 포함하는 면역화학적 진단(immunochemistry diagnostics) 분야의 경우, 전체 체외 진단 시장에서 가장 성숙된 분야로 분석되었으며, 시장은 가장 큰 규모인 35.8%(138억 달러)를 차지하는 것으로 보고되었다. 앞으로 2014년까지 연 평균 5%를 넘는 성장세로 체외 진단 시장 규모가 503억 달러에 달할 것으로 전망하고 있다. 중국 및 인도와 같은 신흥 국가들의 시장 규모가 크게 확대되면서 면역화학적 진단 분야는 연 평균 5% 이상의 성장으로 2014년에 180억 달러 이상의 시장 규모로 확대될 것으로 보인다[11].

기존의 효소결합면역흡착검사는 하나의 항체당 하나의 효소가 결

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: jbkim3@korea.ac.kr

<sup>‡</sup>이 논문은 고려대학교 홍석인 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

합된 형태이기 때문에 감도(sensitivity)의 증가 폭에 그 한계가 있으며, 이를 극복하기 위한 방안으로 하나의 항체당 많은 효소를 결합 시킴으로써 효소결합면역흡착검사의 감도를 혁신적으로 향상시키기 위한 연구가 제안되었다[4]. 효소결합면역흡착검사는 외부환경(온도 및 pH 등)의 변화에 따른 효소의 변성(denaturation)에 의해 효소의 활성이 유지되지 못하고, 이로 인해 성능안정성(performance stability)이 크게 떨어지는 단점이 있다. 하지만 대부분의 연구는 감도를 향상하려는 노력에만 국한되어 왔으며, 성능안정성의 향상을 위한 연구는 미비한 실정이었다.

최근 효소활성을 획기적으로 안정시킬 수 있는 나노바이오촉매(nanobiocatalyst, NBC) 기술이 다양한 분야에서 성공적으로 응용되고 있고, 그 한 예로서 나노바이오촉매를 기반으로 한 새로운 개념의 효소결합면역흡착검사방법이 제안되었다[5,6]. 본 총설에서는 일반적인 효소결합면역흡착검사의 기본원리와 감도향상을 위한 연구, 그리고 성능안정성과 감도를 동시에 향상시킬 수 있는 나노바이오촉매-결합면역흡착검사(Nanobiocatalyst-Linked Immunosorbent Assay, NBC-LISA)에 대하여 살펴보고자 한다.

## 2. 효소결합면역흡착검사(ELISA)

### 2-1. 효소결합면역흡착검사(ELISA)

효소결합면역흡착검사는 항체의 항원에 대한 특이성과 효소의 기질선택 및 촉매반응을 이용하여 바이러스, 병원균 등의 다양한 항원의 유무 및 정량화를 실현하는데 사용되는 면역분석법의 일종이다. 분석하고자 하는 항원을 탐지하기 위해서 효소결합면역흡착검사에서는 효소가 표지된 항체(enzyme conjugated antibody)를 이용한다. Fig. 1은 가장 보편적으로 사용되는 샌드위치 효소면역흡착검사(sandwich-ELISA)의 개요를 도식적으로 나타내고 있다. 1960년대부터 면역검사를 위해 이용되어 온 방사성 표지(radioactive label)와 비교하여 효소표지(enzyme label)는 효소자체가 가지는 기질선택성과 그 촉매반응으로 인한 높은 효율성을 기대할 수 있을 뿐만 아니라, 안전성도 뛰어나다고 할 수 있다. 이와 같은 장점을 바탕으로 하여, 방사성면역측정법(radioimmunoassay, RIA)[7]을 대체할 수 있는 효소결합면역흡착검사 시스템을 1971년에 Perlmann[8]과 Schuurs[9]의 두 그룹이 독립적으로 발표하였다. 이들의 결과를 바탕으로 1976년, Oraganon Teknika사에서 B형간염표면항원(hepatitis B surface antigen, HBsAg)을 탐지할 수 있는 효소결합면역흡착검사 시스템을 세계 최초로 상업적으로 제품화하는데 성공했다[10].

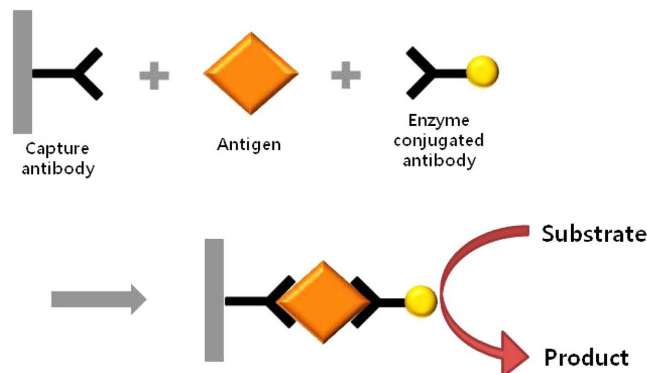


Fig. 1. Schematic of sandwich ELISA(enzyme linked immunosorbent assay).

### 2-2. 효소결합면역흡착검사의 감도 향상에 관한 연구

효소결합면역흡착검사는 효소표지항체가 탐지한 항원의 양을 효소반응의 신호로 나타내는 메커니즘을 기반으로 하고 있다. 하지만 기존의 효소결합면역흡착검사에서는 항체 하나에 하나의 효소가 결합됨으로써 감도를 향상시키는 데 제한이 있을 수 밖에 없었다. 감도를 향상시키기 위한 방안으로서 단위 항체 당 효소의 수를 증가시키는 방법이 제시되었다.

Wang 연구팀[4,12]은 탄소나노튜브(carbon nanotubes, CNTs) 위에 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)를 다층구조(layer by layer (LBL) assembly) 형태로 집적한 복합체를 만든 후 그 위에 항체를 공유결합하였다(Fig. 2A). 항체 하나당 고정화된 효소의 비율을 증가시킴으로써, 기존의 효소결합면역흡착검사에 비해 감도를 1,000배 이상 높은 결과를 얻었다.

Yu 등[13]은 양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)와 항체를 탄소나노튜브 위에 동시에 공유결합시킴으로써 전립선암의 바이오마커인 전립선특이항원(prostate specific antigen, PSA)을 4 pg/ml의 농도까지 탐지할 수 있는 결과를 발표하였다. Malhotra 등[14]은 같은 접근방식을 활용하여 인터루킨-6(interleukin-6, IL6)를 탐지하는 시스템을 개발하고 기존의 시스템에 비해 5배 이상 감도가 향상되고 검출한계(limit of detection, LOD)를 60배 이상 낮춘 결과를 얻었다.

단위 항체당 효소의 수를 증가시키는 방법의 하나로 Monroe 등[15]은 리포솜을 이용한 효소면역검사(liposome immunolysis assay, LILA)에 대한 연구를 발표하였다. 리포솜의 경우 지질 이중막으로 구성되어 있으며 막 사이는 지질성(lipophilic), 막 내부는 친수성(hydrophilic)으로 이루어져 있어 지질성 또는 친수성 물질을 포집하는 데 많이 이용되고 있는 물질이다. 효소를 리포솜 내부에 포집한 후 항체를 표면에 고정화 하여 효소면역검사를 실시하였다. 하지만, Monroe의 방법은 리포솜 내에 포집된 효소와 기질이 반응을 하는데

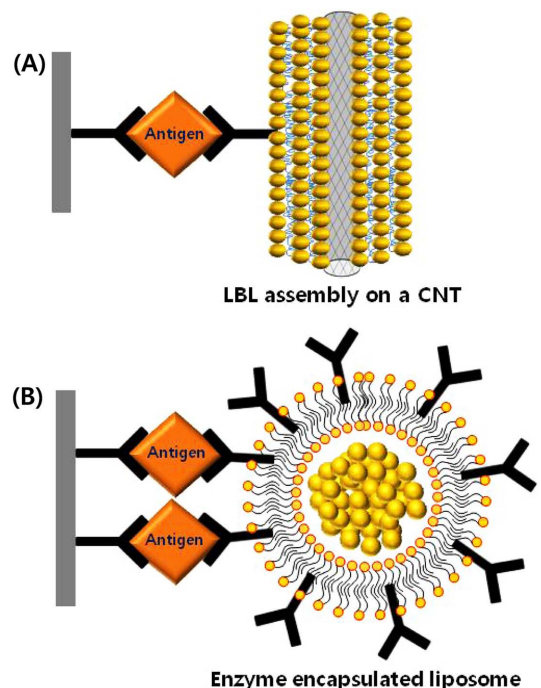


Fig. 2. Modified ELISA' approaches based on (A) the layer-by-layer (LBL) assembly[4] and (B) liposome immunoassay(LIA)[16].

리포솜 자체가 방해막으로 작용을 하게 되어 리포솜 제거과정(lysis)이 추가적으로 필요하다. 이는 빠른 검사를 위한 효소면역검사의 응용에는 걸림돌이 되었다.

이를 수정 보완한 방법이 Hwang 등[16]에 의해 발표된 리포솜 기반 효소면역검사(liposome immunoassay, LIA)이다. Fig. 2B와 같이 리포솜 내부의 양고추냉이 과산화효소를 포집하고, 리포솜 외부에 항체를 고정화하였다. 기질로서는 4-CN(4-chloronaptol)을 사용함으로써 리포솜 내부에 침투하여 양고추냉이 과산화효소와의 반응 후 고분자화되어 리포솜 외부로 반응물이 유출되지 않게 함으로써 전통적인 효소결합면역흡착검사와 비교하여 검출한계를 64배 정도 낮추었다. 이 연구는 세척과정(washing step)에서도 효소-기질의 반응물이 소실되지 않는다는 것과 반응물이 눈으로 식별이 가능하다는 장점을 이용한 고감도 휴대 가능한 단백질 어레이(protein array)로의 응용 가능성을 보여주었다. 또한 앞서 설명한 연구들과는 달리 리포솜 안에 포집된 양고추냉이 과산화효소는 나노물질 표면에 고정화된 것이 아닌 리포솜 내에서 유리효소(free enzyme)의 형태를 띠고 있어, 고정화에 수반되는 효소의 활성 감소를 최소화 하면서 항체당 효소의 비를 증가시킬 수 있었다.

### 3. 나노바이오촉매(NBC)

#### 3-1. 나노바이오촉매(NBC) 접근방식

앞서 설명한 다양한 연구에서는 공통적으로 항체 당 효소의 비를 증가시키는 방법을 이용하여 기존의 효소결합면역흡착검사에 비해 감도를 향상시켰다. 집적된 효소를 이용한 신호 증폭은 극도로 적은 농도의 항원을 탐지할 수 있으며, 항원의 양을 좀 더 정밀하게 측정할 수 있게 하였다. 하지만, 다양한 조건에서 효소결합면역흡착검사의 성공적인 분석을 위해서는 감도뿐만 아니라 그 성능안정성(performance stability)도 중요한 요소이다. 항체와 결합된 효소는 주변 환경의 변화(온도 및 pH의 변화)에 따라 단백질 구조가 변성(denaturation)되어 비활성화될 수 있고, 이는 효소결합면역흡착검사 성능의 불안정성으로 이어지게 된다. 일반적으로 장비가 잘 갖추어진 실험실에서는 효소결합면역흡착검사를 위한 대부분의 시료를 냉장보관함으로써 성능안정성을 확보할 수 있다. 그러나, 생화학전 및 테러에 대한 준비 및 고온의 사막과 같은 극한조건, 또는 현장테스트(field test) 등을 위한 효소결합면역검사의 성공적인 분석은 효소 안정성의 확보가 필수적인 요소라고 할 수 있다.

최근 효소의 안정성을 획기적으로 증가시킬 수 있는 나노바이오촉매(nanobiocatalyst, NBC) 접근방식으로서 나노효소반응기(nanoscale enzyme reactor, NER) 및 효소코팅(enzyme coating, coatings, ECs)[20-22] 기술이 발표되었다. 효소활성이 안정화된 나노바이오촉매들은 효소결합면역흡착검사[5,6]뿐만 아니라 단백질 분해(protein digestion) [21], 바이오센서[3] 및 바이오 연료전지[23] 등의 다양한 분야에서 그 실제 응용 가능성을 보여주고 있다.

#### 3-2. 나노효소반응기(NER)과 효소코팅(EC)

효소의 활성을 향상시킬 수 있는 나노바이오촉매(nanobiocatalyst, NBC) 접근방식으로서 나노효소반응기(nanoscale enzyme reactors, NER)와 효소코팅(enzyme coatings, ECs)에 대해 간략히 살펴보고자 한다.

일반적으로 나노세공성 물질을 효소고정화에 이용하는 경우, 효소의 단순 흡착이 많이 쓰이고 있다. 이러한 접근방식은 효소가 기공에서 빠져 나오는 것을 방지할 수 없기 때문에 그 안정성이 크게 떨어지는 단점이 있다. Lee 등[17]은 40 nm 크기의 구형구조기공과 13 nm 크기의 채널기공이 혼재한 나노세공성 물질을 합성하고, 효소를 단순흡착한 후에 서로 가교결합을 시킴으로써 효소가 빠져 나오지 못하게 하는 ship-in-a-bottle 형식의 나노효소반응기 방법을 개발하였다(Fig. 3A). 단백질분해효소인 키모트립신(alpha-chymotrypsin, CT)의 나노효소반응기를 합성함으로써, 효소 담지량을 효소가 단순 흡착된 경우보다 약 5배 정도 증가시켰으며, 한 달 동안 활성이 일정하게 유지될 수 있는 결과를 얻었다[18]. 또한 자성 분리가 가능한 나노세공성 물질을 사용함으로써 반복 사용이 가능한 나노효소반응기를 개발하였다[19].

나노세공성 물질과는 다르게 나노섬유 및 나노입자의 형태를 이용하는 경우에는 효소를 나노물질의 외부에 흡착 혹은 공유결합을 시킴으로써 효소와 나노물질의 복합체를 만들었다. 하지만 Kim 등[20]은 Fig. 3B와 같이 polystyrene과 poly(styrene-co-maleic anhydride) 기반의 나노섬유 위에 키모트립신을 공유결합한 상태에서 추가적으로 많은 양의 키모트립신을 가교결합시킴으로써 효소가 다층구조의 형태로 고정화되는 효소코팅 방법을 개발하였다. 효소코팅은 기존의 방법에 비해 다량의 키모트립신을 고정시킬 수 있어서 나노섬유 단위 무게당 효소의 활성을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 효소 간의 가교결합을 통해서 활성의 안정성을 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 이러한 연구의 연장선 상에서 Kim 등[21]은 트립신(trypsin, TR)의 활

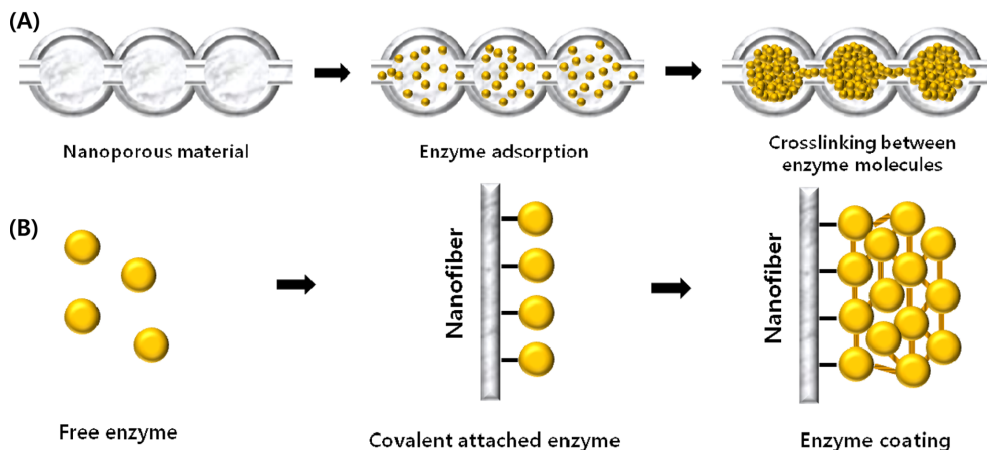


Fig. 3. Nanobiocatalysts: (A) nanoscale enzyme reactors(NER), and (B) enzyme coatings(ECs).

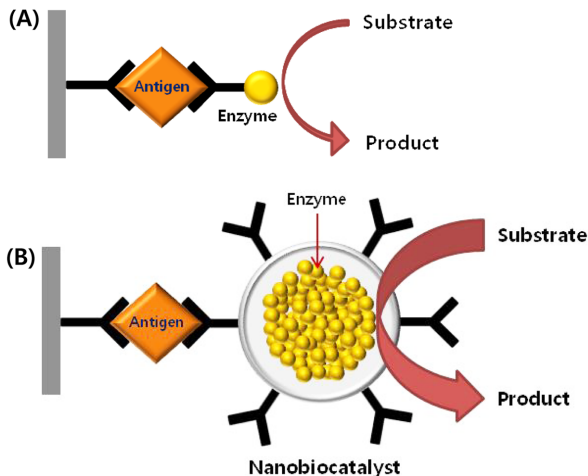


Fig. 4. Comparison of (A) conventional ELISA and (B) nanobiocatalyst-linked immunosorbent assay (NBC-LISA).

성이 1년 이상 안정될 수 있는 획기적인 연구 결과를 발표하고, 이를 활용하여 프로테오믹 분야의 단백질 분해에 그 응용 가능성을 보이기도 하였다. 최근에 Kim 등[22]은 기존의 단순 효소코팅 방법에서 발전된 형태로써 효소식출(enzyme precipitation) 및 가교결합(crosslinking)을 이용하여 당산화효소(glucose oxidase, GOx)를 나노섬유 및 탄소나노튜브에 고정시키는 새로운 효소코팅 방법을 도입하였다. Kim은 이러한 접근방식을 통해 기존의 효소코팅 방법에 비해 효소 담지량을 20배 이상 증가시키고, 효소의 활성이 200일 이상 지속적으로 유지될 수 있음을 보였다.

#### 4. 나노바이오촉매 기반 효소결합면역흡착검사 (NBC-LISA)

앞서 설명한 나노바이오촉매의 높은 효소 담지량과 효소 안정성의 장점을 활용한 변형된 효소결합면역흡착검사에 대한 연구가 진행

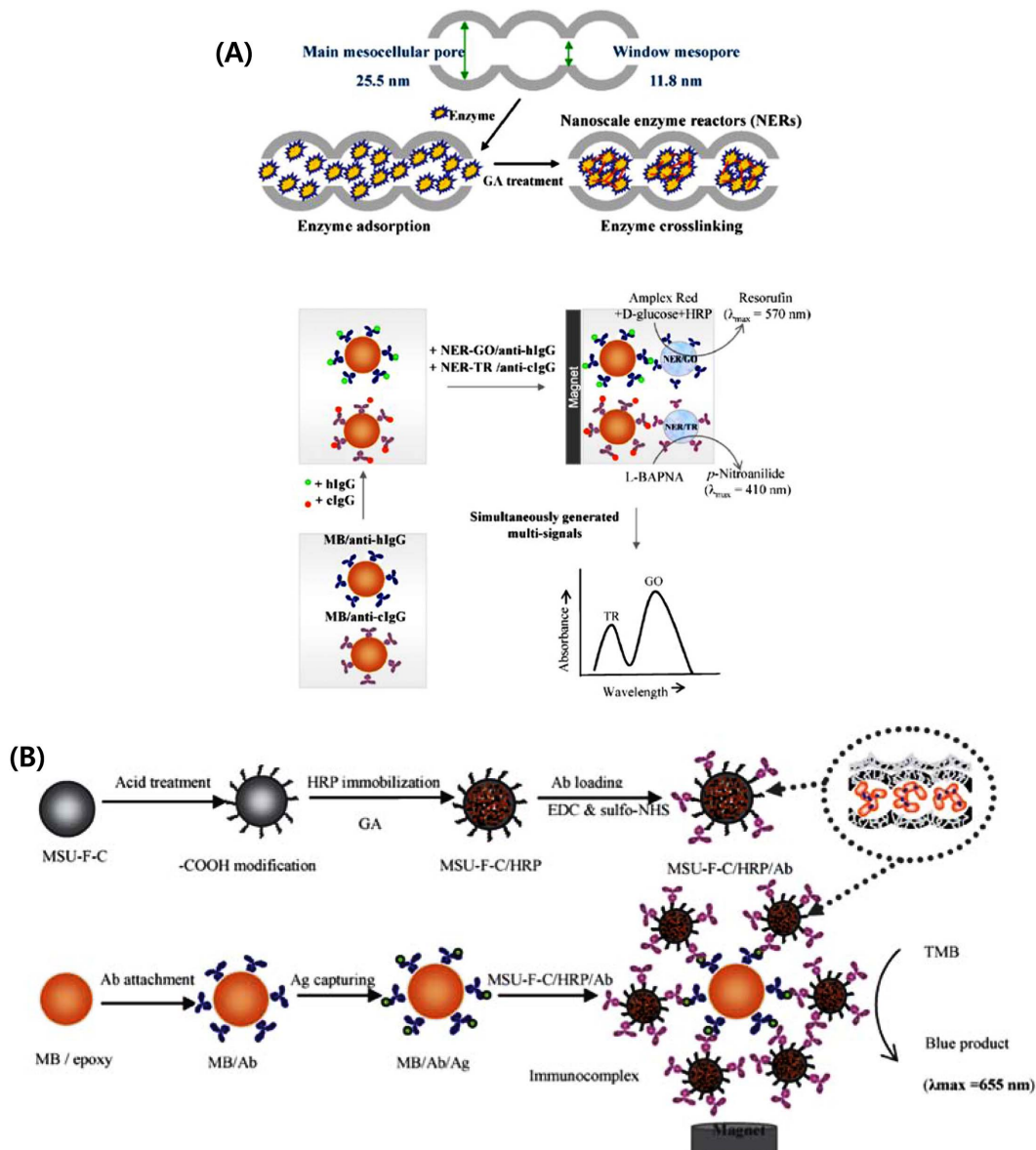


Fig. 5. Schematic diagrams of (A) NER-LISA using mesoporous silica[5] [Biosens. Bioelectron. 25 (2009) 906-912, Copyright© 2010 Elsevier B.V., All rights reserved], and (B) NER-LISA using mesoporous carbon[6] [Analyst 134 (2009) 926-932, Copyright © The Royal Society of Chemistry 2010, All rights reserved].



되고 있다. Fig. 4에서와 같이 효소결합면역흡착검사에서 하나의 효소분자 대신에 나노바이오촉매를 활용할 경우, 효소반응에 의해 발생하는 신호를 증폭시킬 수 있을 뿐만 아니라, 그 신호를 안정시킬 수 있어서, 앞서 설명한 극한 조건에서도 사용할 수 있는 효소결합면역흡착검사의 가능성을 보여주고 있다.

Piao 등[5]은 나노효소반응기 방법을 이용해서 나노세공성 실리카(mesoporous silica)의 내부에 당산화효소와 트립신을, 외부에는 항체를 고정화함으로써 나노바이오촉매 기반의 효소결합면역흡착검사 시스템을 구축하였다(Fig. 5A). 이를 통해 인간 면역글로불린 G(human-IgG)를 67 pM까지 측정할 수 있음을 보였으며, 기존의 효소결합면역흡착검사에 비해 약 20배 이상의 감도 증가를 확인하였다. 또한 당산화효소와 트립신(trypsin)이 각각 고정화된 두 종류의 입자들을 가지고 두 가지 다른 항원들을 동시에 탐지할 수 있는 다중항원진단방법(multiplexed immunoassay)을 성공적으로 개발하였다.

또한 Piao 등[6]은 나노세공성 탄소의 일종인 MSU-F-C를 활용하여 나노효소반응기 방법을 통해 양호추냉이 과산화효소를 세공 내부에 고정하고 항체를 외부에 고정화하였다(Fig. 5B). 분광광도계(spectrophotometer)를 통해 광학적으로 측정한 결과, 인간의 면역글로불린 G의 검출범위(dynamic range)가 5 ng/ml에서 100 ng/ml로 측정되었으며, 검출한계가 33 pM임을 확인하였다. 또한 일반적인 효소결합면역흡착검사와 비교하여 40 °C의 극한의 환경에서도 효소에 의해 발생하는 신호가 24시간 이상 거의 일정하게 유지됨을 확인함으로써, 나노바이오촉매 기반의 효소결합면역흡착검사가 외부 환경 변화에 매우 견고하다는 것을 보였다.

나노바이오촉매 기반의 효소결합면역흡착검사는 나노바이오촉매에 의한 효소활성 증가와 더불어 효소 안정성을 활용함으로써, 그 감도와 성능안정성을 동시에 개선할 수 있다. 이러한 측면에서 나노바이오촉매 기반 효소결합면역흡착검사는 전통적인 효소결합면역흡착검사의 한계를 극복할 수 있는 새로운 방향을 제시할 것으로 사료된다.

## 5. 결 론

본 총설에서는 효소결합면역흡착검사의 감도와 성능안정성을 확보할 수 있는 다양한 노력에 대해 살펴보았다. 또한 나노기술이 효소기술에 응용된 형태로서 나노바이오촉매를 합성하는 여러 방법에 대해 간략히 살펴보았고, 나노바이오촉매가 가진 장점들과 이를 활용한 나노바이오촉매 기반 효소결합면역흡착검사가 갖는 우수한 효과에 대해 논하였다. 나노바이오촉매를 이용한 효소면역흡착검사의 경우, 나노바이오촉매의 높은 담지량을 이용하여 감도를 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 나노바이오촉매의 높은 효소안정성을 기반으로 성능안정성을 확보할 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 또한 단분자 효소입자(single enzyme nanoparticles, SENs)[24]와 같은 새로운 나노바이오촉매 기술들이 개발되고 있는 상황을 고려할 때, 앞으로의 나노바이오촉매 기반 효소결합면역흡착검사 방법의 발전가능성이 높게 평가될 수 있다. 이러한 발전 양상이 유지된다면 나노바이오촉매 기반의 효소결합면역흡착검사는 감도와 성능안정성의 확보를 통해 보다 다양한 분야에서 성공적인 응용을 실현하리라 예상된다.

## 감 사

이 논문은 고려대학교 홍석인 교수님의 정년을 기념하여 투고되

었으며, 이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단-신기술융합형 성장동력사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다(2009-0082314). 연구비 지원에 감사 드립니다.

## 참고문헌

1. Koeller, K. M. and Wong, C.-H., "Enzymes for Chemical Synthesis," *Nature*, **409**(6817), 232-240(2001).
2. Duran, N. and Esposito, E., "Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: A Review," *Appl. Catal., B*, **28**(2) 83-99(2000).
3. Lee, D., Lee, J., Kim, J., Na, H. B., Kim, B., Shin, C. H., Kwak, J. H., Dohnalkova, A., Grate, J. W., Hyeon, T. and Kim, H. S., "Simple Fabrication of a Highly Sensitive and Fast Glucose Biosensor Using Enzymes Immobilized in Mesocellular Carbon Foam," *Adv. Mater.*, **17**(23), 2828-2833(2005).
4. Wang, J., Liu, G. D. and Jan, M. R., "Ultrasensitive Electrical Biosensing of Proteins and DNA: Carbon-nanotube Derived Amplification of the Recognition and Transduction Events," *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(10), 3010-3011(2004).
5. Piao, Y., Lee, D., Lee, J., Hyeon, T., Kim, J. and Kim, H. S., "Multiplexed Immunoassay Using the Stabilized Enzymes in Mesoporous Silica," *Biosens. Bioelectron.*, **25**(4), 906-912(2009).
6. Piao, Y., Lee, D., Kim, J., Hyeon, T. and Kim, H. S., "High Performance Immunoassay Using Immobilized Enzyme in Nanoporous Carbon," *Analyst*, **134**(5) 926-932(2009).
7. Yalow, R. S. and Berson, S. A., "Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods," *Nature*, **184**(4699), 1648-1649(1959).
8. Engvall, E. and Perlmann, P., "Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin-G," *Immunochemistry*, **8**(9), 871-874(1971).
9. Vanweeme, B. and Schuurs, A. H. W., "Immunoassay Using Antigen-enzyme Conjugates," *FEBS Lett.*, **15**(3), 232-236(1971).
10. Haas, H. and Hotz, G., "Rapid Detection of HBsAg and anti-HBs by Enzyme-immunoassay," *J. Virol. Methods*, **2**(1-2) 63-69(1980).
11. Strategic Analysis of the Global In Vitro Diagnostics Market, Frost & Sullivan(2010).
12. Munge, B., Liu, G. D., Collins, G. and Wang, J., "Multiple Enzyme Layers on Carbon Nanotubes for Electrochemical Detection Down to 80 DNA Copies," *Anal. Chem.*, **77**(14), 4662-4666(2005).
13. Yu, X., Munge, B., Patel, V., Jensen, G., Bhirde, A., Gong, J. D., Kim, S. N., Gillespie, J., Gutkind, J. S., Papadimitrakopoulos, F. and Rusling, J. F., "Carbon Nanotube Amplification Strategies for Highly Sensitive Immunodetection of Cancer Biomarkers," *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(34), 11199-11205(2006).
14. Malhotra, R., Patel, V., Vaque, J. P., Gutkind, J. S. and Rusling, J. F., "Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification," *Anal. Chem.*, **82**(8), 3118-3123(2010).
15. Monroe, D., "Novel Liposome Immunoassays for Detecting Antigens, Antibodies, and Haptens," *J. Liposome Res.*, **1**(3), 339-377(1989).
16. Hwang, S., Kumada, Y., Seong, G., Choo, J., Katoh, S. and Lee, E., "Characteristics of a Liposome Immunoassay on a Poly(methyl methacrylate) Surface," *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**(7), 2251-2257(2007).

17. Lee, J., Kim, J., Jia, H. F., Kim, M. I., Kwak, J. H., Jin, S. M., Dohnalkova, A., Park, H. G., Chang, H. N., Wang, P., Grate, J. W. and Hyeon, T., "Simple Synthesis of Hierarchically Ordered Mesocellular Mesoporous Silica Materials Hosting Crosslinked Enzyme Aggregates," *Small*, **1**(7), 744-753(2005).
18. Kim, M. I., Kim, J., Lee, J., Jia, H., Bin Na, H., Youn, J. K., Kwak, J. H., Dohnalkova, A., Grate, J. W., Wang, P., Hyeon, T., Park, H. G. and Chang, H. N., "Crosslinked Enzyme Aggregates in Hierarchically-ordered Mesoporous Silica: A Simple and Effective Method for Enzyme Stabilization," *Biotechnol. Bioeng.*, **96**(2), 210-218(2007).
19. Lee, J., Bin Na, H., Kim, B. C., Lee, J. H., Lee, B., Kwak, J. H., Hwang, Y., Park, J. G., Gu, M. B., Kim, J., Joo, J., Shin, C. H., Grate, J. W. and Hyeon, T., "Magnetically-separable and Highly-stable Enzyme System Based on Crosslinked Enzyme Aggregates Shipped in Magnetite-coated Mesoporous Silica," *J. Mater. Chem.*, **19**(42), 7864-7870(2009).
20. Kim, B. C., Nair, S., Kim, J., Kwak, J. H., Grate, J. W., Kim, S. H. and Gu, M. B., "Preparation of Biocatalytic Nanofibres with High Activity and Stability Via Enzyme Aggregate Coating on Polymer Nanofibres," *Nanotechnology*, **16**(7), S382-S388(2005).
21. Kim, B. C., Lopez-Ferrer, D., Lee, S. M., Ahn, H. K., Nair, S., Kim, S. H., Kim, B. S., Petritis, K., Camp, D. G., Grate, J. W., Smith, R. D., Koo, Y. M., Gu, M. B. and Kim, J., "Highly Stable Trypsin-aggregate Coatings on Polymer Nanofibers for Repeated Protein Digestion," *Proteomics*, **9**(7), 1893-1900(2009).
22. Kim, B. C., Zhao, X., Ahn, H.-K., Kim, J. H., Lee, H.-J., Kim, K. W., Nair, S., Hsiao, E., Jia, H., Oh, M.-K., Sang, B. I., Kim, B.-S., Kim, S. H., Kwon, Y., Ha, S., Gu, M. B., Wang, P. and Kim, J., "Highly Stable Enzyme Precipitate Coatings and Their Electrochemical Applications," *Biosens. Bioelectron.*, **26**(5), 1980-1986 (2011).
23. Kim, J., Jia, H. F. and Wang, P., "Challenges in Biocatalysis for Enzyme-based Biofuel Cells," *Biotechnol. Advances*, **24**(3), 296-308(2006).
24. Kim, J. and Grate, J. W., "Single-enzyme Nanoparticles Armored by a Nanometer-scale Organic/inorganic Network," *Nano Lett.*, **3**(9), 1219-1222(2003).