



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월09일

(11) 등록번호 10-2154351

(24) 등록일자 2020년09월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/483 (2006.01) *A61B 5/00* (2006.01)
G01N 27/417 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/4836 (2013.01)
A61B 5/6868 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0040972
 (22) 출원일자 2019년04월08일
 심사청구일자 2019년04월08일
- (56) 선행기술조사문헌
 윤진호, 서강대학교 박사학위논문.(2018.06.30.)*
 (뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
 서강대학교산학협력단
 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
- (72) 발명자
 최정우
 서울특별시 용산구 서빙고로 35 용산시티파크1단지아파트 103-603
- 윤진호
 서울특별시 서초구 서운로 221 래미안서초스위트아파트 102동 2105호
- 이택
 서울특별시 동작구 상도로53길 8 래미안상도3차아파트 316동 1403호
- (74) 대리인
 윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 13 항

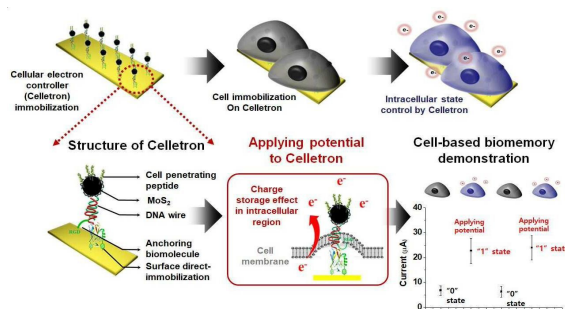
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 세포 내부 전하상태 제어용 셀레트론 및 이를 이용한 세포의 전기화학 신호 제어 및 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 세포에 생체 친화적으로 침투가 가능한 생체물질/유기/무기물질로 구성된 셀레트론(Celletron; cellular electrochemical signal controller), 및 이를 이용한 세포의 전기화학 신호를 제어 및 측정 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류
G01N 27/417 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR101905317 B1
US20170143762 A1
KR1020130068936 A
KR1020150123373 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1A6A1A03012845
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원사업
연구과제명	뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013K1A4A3055268
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	해외우수연구기관유치사업
연구과제명	서강-하버드 질병 바이오물리 연구 센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2018.07.01 ~ 2019.04.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는 셀레트론 제작 방법.

기관에 재조합 단백질 및 DNA의 복합체를 고정화하는 고정화 단계;

복합체의 DNA와 상보적인 DNA를 결합시켜 dsDNA를 형성시키는 dsDNA 형성 단계;

카르복실기로 표면이 개질된 MoS₂ 입자를 dsDNA에 결합시키는 MoS₂ 결합 단계;

상보적인 DNA의 아민기에 RGD 펩타이드를 결합시키는 RGD 펩타이드 결합 단계; 및

카르복실기로 표면이 개질된 MoS₂ 입자에 CPP 펩타이드를 결합시키는 CPP 펩타이드결합 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고정화는 재조합 단백질의 시스테인기를 통하여 고정화된 것인, 셀레트론 제작 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 상보적인 DNA의 양쪽 말단은 아민기를 포함하는 것인, 셀레트론 제작 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 MoS₂ 결합 단계는 EDC/NHS 반응을 통하여 수행되는 것인, 셀레트론 제작 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 MoS₂ 입자와 DNA는 공유결합된 것인, 셀레트론 제작 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 재조합 단백질 및 DNA의 복합체는 하기의 단계를 통해 제작된 것인, 셀레트론 제작 방법:

씨올기를 포함하는 DNA의 다이설파이드 결합을 끊는 단계;

설포숙시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1카복실레이트(sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)를 첨가하여 반응시키는 단계;

재조합 아주린을 첨가하여 반응시키는 단계.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 MoS₂ 입자는 하기의 단계를 통해 제작된 것인, 셀레트론 제작 방법:

몰리브덴산 나트륨(sodium molybdate) 수용액을 준비하는 단계;

4-암모늄 벤조산(4-ammonium benzoic acid)을 녹인 에탄올 수용액과 몰리브덴산 나트륨 수용액을 혼합하는 단계;

황화나트륨(sodium sulfide)을 첨가하는 단계;

하이드라진 하이드레이트(hydrazine hydrate)를 첨가하는 단계; 및

염산을 첨가하는 단계.

청구항 8

기관에 고정된 재조합 단백질 및 DNA의 복합체, 복합체의 DNA와 결합한 상보적인 DNA, dsDNA와 결합된 카르복실

기로 표면이 개질된 MoS₂ 입자, 상보적인 DNA에 결합된 RGD 펩타이드, MoS₂ 입자에 결합된 CPP 펩타이드를 포함하는 셀레트론.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 재조합 단백질은 재조합 아주린인 것인, 셀레트론.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 DNA는 20 내지 40개의 염기로 이루어진 것인, 셀레트론.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 DNA는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 셀레트론.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 상보적인 DNA는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것인, 셀레트론.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 RGD 펩타이드는 상보적인 DNA의 아민기에 결합된 것인, 셀레트론.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포에 생체 친화적으로 침투가 가능한 생체물질/유기/무기물질로 구성된 셀레트론(Celletron; cellular electrochemical signal controller), 및 이를 이용한 세포의 전기화학 신호를 제어 및 측정 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 과학 분야에서 생명체의 뇌는 의사 결정과 논리적 사고 결정 등 생명체의 필수적인 핵심 기능을 수행하기 때문에 주요 연구 대상 중 하나이다. 그러나 지금까지는 뇌에 저장된 신호 체계의 원리나 메커니즘, 그리고 기억의 저장 원리가 아직 명확히 밝혀진 바는 없다.

[0003] 기본적으로 뇌는 무수한 신경 세포로 구성된다. 신경 세포는 전기 신호 또는 화학 신호를 사용하여 뇌의 신호 전달 유닛으로 취급된다. 그리고 이런 신호는 신경 세포를 통해 특정 경로를 따라 전송된다. 이러한 특정 경로는 특정 패턴으로 뇌에서 인식되며, 뇌는 신호 경로의 패턴을 분석하고, 이와 같은 특정 패턴은 기억으로 뇌 속에 저장된다고 알려져 있다. 이와 같은 과정이 일반적으로 알려진 뇌 속에 기억이 저장되는 원리이다.

[0004] 또한, 또한 전기적인 신호 전달이나 이온 채널을 이용한 세포 신호 전달 체계에 발생하는 문제는 알츠하이머 병과 파킨슨 병과 같은 뇌 질환의 발병 원인과 관련이 되어 있다.

[0005] 이와 같은 관점에서 세포 내 전기 신호 제어 기술 또는 전하상태 제어 기술은 근본적인 뇌의 메커니즘과 기억의 원리를 연구하는데 있어서 필수적으로 요구되는 기술이다.

[0006] 그러나 세포 내 신호 전달에 대한 대부분의 연구는 정교한 세포 내 신호 측정이나 단순한 세포 내 전기적 자극을 가하는데 초점을 맞추고 있다. 또한, 기존의 세포 내 신호 측정이나 전기적 자극에 이용되는 대부분의 전극들은 세포에 유해한 무기 또는 유기물질로 구성되어 있어 세포에 좋지 않은 영향을 미친다는 한계점을 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 생체 적합성을 가지고 세포의 전하 상태를 조절하기 위해 단백질, DNA 및 MoS₂로 구성된 셀레트론 (Celletron, cellular electrochemical signal controller) 개발하였다. 개발된 셀레트론을 이용하여

세포 내 세포 무해 침투가 가능하며, MoS_2 의 축전효과 기능을 이용하여 전압 인가 시 세포 내 전하상태의 제어가 가능하며, 이를 통하여 세포의 전기화학 신호를 제어하였으며, 이를 통해 세포 기반 메모리 소자 장치로 응용을 하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은 세포 내부 전하상태 제어를 위한 셀레트론을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 세포 내부 전하상태 제어를 위한 셀레트론의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 셀레트론을 이용한 세포의 전기화학 신호 제어 및 측정 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 셀레트론의 세포 내부 전하상태 제어 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 지금까지 우리 뇌 속의 기억의 저장 메커니즘 또는 정확한 신호 전달 체계에 대해서 명확하게 밝혀진 바는 없으나, 우리 뇌는 수 없이 많은 신경세포로 구성되어 있다. 이와 같은 신경세포는 뇌의 신호전달 유닛으로 전기적인 또는 화학적인 신호 전달에 있어서 중요한 역할을 수행한다.

[0013] 이런 신호전달 체계에 문제가 발생할 시에 뇌질환과 같은 질병이 발병을 하고 치매 등의 병의 발병이 가능하다. 이와 같은 과정에서 신경세포의 신호전달을 제어하는 것은 뇌에 대한 근본적인 분석 연구에 필수적으로 요구되는 기술이다.

[0014] 이에, 본 발명에서는 세포 내부 전하상태 제어를 통한 신호전달 제어를 구현하기고 세포 기반의 메모리 소자 개발에 응용하고자 셀레트론을 개발하고자 하였다.

[0015] 본 발명은 세포에 생체 친화적으로 침투가 가능한 생체물질/유기/무기물질로 구성된 셀레트론(Celletron; cellular electrochemical signal controller), 및 이를 이용한 세포의 전기화학 신호를 제어 및 측정 방법에 관한 것으로, 세포 기반 메모리소자와 같은 세포 기반 바이오전자소자 장치 개발에 응용 가능하다.

[0016] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0017] 본 발명은 세포 내부의 전하상태 제어를 구현하고자 금속단백질/DNA/ MoS_2 로 구성된 생체복합물인 셀레트론(Celletron, cellular electrochemical signal controller)을 제작하고, 이를 이용하여 세포 내부 세포 무해 침투를 통한 MoS_2 의 축전기능을 이용한 세포 내부 전하상태 제어를 구현하였다.

[0018] 본 발명의 일 예는 세포 내부 전하상태 제어를 위한 셀레트론 제조 방법에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 셀레트론 제조 방법은 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 기관에 재조합 단백질 및 DNA의 복합체를 고정화하는 고정화 단계;

[0021] 복합체의 DNA와 상보적인 DNA를 결합시켜 dsDNA를 형성시키는 dsDNA 형성 단계;

[0022] MoS_2 입자를 dsDNA에 결합시키는 MoS_2 결합 단계;

[0023] 상보적인 DNA의 아민기에 RGD 펩타이드를 결합시키는 RGD 펩타이드 결합 단계; 및

[0024] 카르복실기로 표면이 개질된 MoS_2 입자에 CPP 펩타이드를 결합시키는 CPP 펩타이드 결합 단계.

[0025] 본 발명에 있어서 상기 고정화는 재조합 단백질의 시스테인기를 통하여 고정화되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서 상기 재조합 단백질은 금속단백질인 것일 수 있으며, 예를들어, 아주린인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 있어서 상기 재조합 단백질은 기관 상 직접 고정화가 가능하도록 시스테인(Cysteine) 기가 재조합된 것일 수 있으며, 예를 들어, 아주린의 92번째 아미노산 잔기인 라이신(Lys)이 시스테인(Cys)으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에 있어서 상기 DNA는 20 내지 40 개, 20 내지 35 개, 20 내지 30 개, 25 내지 40 개, 25 내지 35 개, 예를 들어, 25 내지 30개의 염기로 이루어진 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것

일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0029] 본 발명에 있어서 상기 상보적인 DNA는 상기 DNA와 상보적으로 결합 가능한 서열인 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 있어서 상기 상보적인 DNA의 적어도 한 쪽 말단은 아민기를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상보적인 DNA의 양쪽 말단은 아민기를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에 있어서 상기 MoS₂ 결합 단계는 EDC/NHS 반응을 통하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 있어서 상기 MoS₂ 입자의 직경은 10 내지 20 nm인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에 있어서 상기 MoS₂ 입자는 표면에 카르복실기로 표면이 개질된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에 있어서 상기 MoS₂ 입자와 DNA는 공유결합된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에 있어서 상기 RGD 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에 있어서 상기 CPP 펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 제조합 단백질 및 DNA의 복합체는 하기의 단계를 통해 제작된 것인일 수 있다:
- [0038] 씨울기를 포함하는 DNA의 다이설파이드 결합을 끊는 단계;
- [0039] 설포숙시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1카복실레이트 (sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)를 첨가하여 반응시키는 단계;
- [0040] 제조합 아주린를 첨가하여 반응시키는 단계.
- [0041] 본 발명의 MoS₂ 입자는 하기의 단계를 통해 제작된 것인, 셀레트론 제작 방법:
- [0042] 몰리브덴산 나트륨(sodium molybdate) 수용액을 준비하는 단계;
- [0043] 4-암모늄 벤조산(4-ammonium benzoic acid)을 녹인 에탄올 수용액을 준비하는 단계;
- [0044] 황화나트륨(sodium sulfide)을 첨가하는 단계;
- [0045] 하이드라진 하이드레이트(hydrazine hydrate)를 첨가하는 단계; 및
- [0046] 염산을 첨가하는 단계.
- [0047] 본 발명의 다른 일 예는 세포 내부 전하상태 제어를 위한 셀레트론에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명의 셀레트론은 기관에 고정된 제조합 단백질 및 DNA의 복합체, 복합체의 DNA와 결합한 상보적인 DNA, dsDNA와 결합된 MoS₂ 입자, 상보적인 DNA에 결합된 RGD 펩타이드, MoS₂ 입자에 결합된 CPP 펩타이드를 포함하는 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 셀레트론은 크게 두 가지 부분으로 구성되어 있다.
- [0050] 세포 외부에 위치한 제조합 단백질 및 DNA로 구성된 신체 부위(복합체)와 세포 내부에 위치하게 되는 상보적인 DNA 및 MoS₂로 구성된 머리 부위이다.
- [0051] 본 발명에 있어서 상기 두 부위는 복합체의 DNA와 이와 상보적인 DNA의 상보적인 결합을 통하여 연결되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에 있어서 상기 제조합 단백질은 금속단백질인 것일 수 있으며, 예를들어, 아주린인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명에 있어서 상기 제조합 단백질은 기관 상 직접 고정화가 가능하도록 시스테인(Cysteine) 기가 제조합된

것일 수 있으며, 예를 들어, 아주린의 92번째 아미노산 잔기인 라이신(Lys)이 시스테인(Cys)으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0054] 본 발명에 있어서 상기 DNA는 20 내지 40 개, 20 내지 35 개, 20 내지 30 개, 25 내지 40 개, 25 내지 35 개, 예를 들어, 25 내지 30개의 염기로 이루어진 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에 있어서 상기 상보적인 DNA는 상기 DNA와 상보적으로 결합 가능한 서열인 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명에 있어서 상기 상보적인 DNA의 적어도 한 쪽 말단은 아민기를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상보적인 DNA의 양쪽 말단은 아민기를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명에 있어서 상기 MoS₂ 입자의 직경은 10 내지 20 nm인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 또한, 상기 MoS₂ 입자는 표면에 카르복실기로 표면이 개질된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명에 있어서 상기 MoS₂ 입자와 DNA는 공유결합된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에 있어서 상기 RGD 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 또한, 본 발명에 있어서 상기 상기 MoS₂ 입자에는 CPP 펩타이드(세포투과 펩타이드)가 결합되어 있으며, 세포 내 무해한 세포 내부 침투가 가능하도록 하였다.
- [0062] 본 발명에 있어서 상기 CPP 펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 셀레트론은 세포 내부 전하상태 및 전기화학 신호의 제어가 가능하게 하였으며, 나아가 세포 기반의 메모리 소자 및 전자소자 장치의 개발에 이용 가능하며, 궁극적으로 신경질환 및 뇌질환 치료에 이용 가능한 플랫폼 제작 기술을 제공 가능하다.

발명의 효과

- [0064] 본 발명은 세포에 생체 친화적으로 침투가 가능한 생체물질/유기/무기물질로 구성된 셀레트론(Celletron; cellular electrochemical signal controller), 및 이를 이용한 세포의 전기화학 신호를 제어 및 측정 방법에 관한 것으로, 세포 기반 메모리소자와 같은 세포 기반 바이오전자소자 장치 개발에 응용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 셀레트론의 구조 및 기관 상에 셀레트론의 고정화, 그리고 그 위에 세포를 키운 뒤에 전압 인가에 따라 셀레트론의 MoS₂의 축전효과로 세포 내부의 전하상태 제어를 표현한 이미지이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 기관 상에 셀레트론의 제작과정을 나타낸 이미지이다.
- 도 3는 본 발명의 일 실시예에 따라 셀레트론을 구성하는 요소들의 제작 및 기능을 확인한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 셀레트론의 제작 및 기관 상 고정화를 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 셀레트론의 세포 내 절반 투과가 가능한지를 확인하는 실험 과정의 이미지이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 셀레트론의 세포 내 절반 투과가 가능한지를 확인하는 실험 이미지의 결과 데이터이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 세포 내부 전하상태 제어 구현 및 신호 측정을 위하여 제작된 패터칩의 도면 및 이미지이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된 패터칩 상에 셀레트론의 고정화 과정을 보여주는 모식도이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 셀레트론이 고정화된 패터칩 위에 세포를 키운 뒤에, 세포 내 침투한 셀레

트론에 전압 인가 여부에 따른 제어된 세포의 전기화학 신호 (Chronoamperometry) 결과를 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 셀레트론 제작

제작되는 셀레트론은 도 1과 같은 과정을 통하여 세포 내부 세포 무해 침투 및 셀레트론에 위치하는 MoS₂의 촉진 기능을 통하여 세포 내 전하상태 제어 및 세포의 전기화학 신호 변화제어가 가능하다.

이를 위한 셀레트론의 제작과정은 도 2와 같다. 구체적으로, 금 기판 상에 단백질/DNA 복합체를 재조합 단백질의 시스테인기를 통하여 직접 고정화하였다. 그 위에 양쪽 끝에 아민기를 가진 상보적인 DNA가닥을 고정화 하였다. 그 뒤, EDC/NHS 반응을 통하여 공유결합으로 MoS₂ 입자를 고정화 한 뒤, 상보적인 DNA 가닥의 밑 쪽에 위치하는 아민기 (Amine) 부분에 RGD 펩타이드를 고정화 하고, 마지막으로 CPP를 맨 위쪽에 EDC/NHS 반응을 통하여 고정화하여 셀레트론을 제작하였다.

표 1

서열번호	명명	서열	비고
1	Linker DNA	thiol-AAAAATCAAAAAACCCCCCCCCCCCCC	
2	Complementary DNA	amine-AAATAAAAAGGGGGGGGGGGGGGGTT-amine	
3	RGD	RGD	
4	CPP	GRKKRRQRRRPQ	

실시예 2. 셀레트론을 이루는 구성요소의 제작 및 기능 확인

셀레트론의 구성요소 제작 및 기능 확인은 크게 네 가지로 나뉘어 볼 수 있다. 표면 개질된 MoS₂ 입자의 제작 및 세포 내 독성 확인, 단백질/DNA 복합체 제작, MoS₂와 DNA의 연결 확인 및 RGD 펩타이드를 통한 세포막 내 결합을 확인하는 것이다.

2-1. MoS₂ 입자의 제작

MoS₂ 입자의 제작은 다음과 같이 진하였다. 1g의 몰리브덴산 나트륨(sodium molybdate)을 증류수 50mL에 녹였다. 그 뒤, 증류수/에탄올 혼합용액 50mL에 녹인 2g의 4-암모늄 벤조산(4-ammonium benzoic acid) 용액을 넣어주었다. 이 물질은 합성이 되는 입자의 표면개질에 이용된다. 60℃의 온도에서 30 분의 반응을 시킨 뒤, 황화나트륨(sodium sulfide)과 하이드라진 하이드레이트(hydrazine hydrate)를 30 분 간격으로 첨가하였다. 그 뒤, 2 몰 농도의 염산을 넣어주고, 100 도의 온도에서 6시간 동안 반응시키면 용액의 색깔이 변하도록 하였다. 그 뒤, 여과지를 통하여 필터링을 하여 여과지에 걸러진 파우더를 수득하였다. 증류수와 에탄올로 반복적으로 세척 후, 70℃ 온도의 오븐에서 건조시켜 카르복실기로 표면이 개질된 MoS₂ 나노입자를 수득하였다.

나노입자의 제작은 TEM (Transmission electron microscopy)와 EDS (Energy dispersive X-ray spectroscopy)로 확인하였다. 그 뒤, 이 나노입자를 신경암세포 (SH-SY5Y)에 넣어준 뒤에 48 시간 후에 MTT 실험을 통하여 세포의 활성을 측정하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

TEM 이미지는 합성된 카르복실기가 도입된 MoS₂의 제작 결과를 보여주며, EDX 분석을 통하여 Mo, S 및 카르복실기의 O 원소가 나옴으로 성분 분석을 하였다. 그 뒤 합성된 MoS₂의 세포 내 독성 테스트를 진행한 결과를 콘포칼 이미지와 MTT로 확인하였다. 콘포칼 이미지에는 세포 내로 투입된 MoS₂ 입자를 확인 가능하며, MTT 결과 0.2 mg/mL 농도의 입자량까지는 세포 내 투입 후 48시간 후까지 세포의 활성이 잘 유지됨을 확인할 수 있었다. 그 뒤, 단백질/DNA 복합체의 제작을 전기영동을 통하여 확인하였다. DNA만 있는 경우의 라인과 비교하여 더 높은 곳에 밴드가 형성됨을 통하여 복합체의 제작을 확인할 수 있었다. MoS₂와 상보적인 DNA 가닥의 EDC/NHS를 통한 연결 역시 전기영동을 통하여 더 높은 곳에 복합체의 밴드가 나타남을 통하여 확인 가능하였다. 마지막으로 단백질에 연결된 두가닥의 DNA 중 단백질에 직접 붙지 않는 상보적인 DNA 가닥에 연결되는 RGD 펩타이드를 통한 단백질/DNA 복합체의 세포막의 부착을 확인하였다. 단백질에 재조합으로 도입된 시스테인 기에 말레이미드기가

있는 texasred 형광을 붙여서 콘포칼로 확인 결과, 세포막을 따라 texasred의 붉은 형광이 나타남을 통하여 RGD 펩타이드를 통한 세포막내 고정화 기능을 확인할 수 있었다.

[0081] **2-2. 단백질/DNA 복합체를 제작**

[0082] 단백질/DNA 복합체는 Sulfo-SMCC 화학작용기를 메개체로 하여 단백질과 DNA가 연결되어 완성된다. 구체적으로, 싸울기가 달린 DNA의 Disulfide 결합을 DTT를 이용하여 끊어주었다. 10 uL의 1.0 N 농도의 DTT를 100 uL 의 10 uM 농도의 DNA와 상온에서 30분동안 반응시키고, 그 뒤 에틸아세테이트를 사용하여 DTT를 제거하였다. 그 뒤, sulfo-SMCC (0.5 mg의 sulfo-SMCC를 100 uL의 증류수에 녹여서 준비)를 10 uL 넣어주고 냉장고에서 2 시간 동안 반응시켰다. 그 뒤, 단백질로 이용된 재조합 아주린을 0.1 mg/mL 농도로 100 uL 넣어준 뒤 냉장고에서 3시간 동안 반응시켜 단백질/DNA 복합체를 수득하였다. 완성된 복합체는 TBE Native 전기영동을 통하여 확인하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0083] 전기영동 실험을 통하여, DNA만 있는 라인, 단백질/DNA 복합체만 있는 라인과 비교하여, 단백질/DNA/MoS₂의 경우 크기와 무게가 더 증가하고 그에 따라서 더 높은 위치에 밴드가 나타남을 통하여, 단백질/DNA/MoS₂ 복합체가 만들어짐을 확인하였다. 그 뒤 기관 상에 만들어진 단백질/DNA/MoS₂의 결과를 SEM을 통하여 확인 가능하였다. 마지막으로 STM으로 확인결과, 예상되었던 단백질/DNA/MoS₂의 높이 20 nm와 유사한 높이를 가지는 복합물질이 기관 상에 고정화되어 있음을 확인함으로써 셀레트론의 기관 상 고정화를 확인 가능하였다.

[0085] **2-3. MoS₂와 DNA의 연결**

[0086] 증류수에 녹인 MoS₂ 나노입자 1 mL에 EDC 0.4 mg과 NHS 0.6mg을 넣어준 뒤 상온에서 30분동안 반응을 시키고, 그 뒤에 10 uM 농도의 양쪽에 아민기를 가진 상보적인 DNA를 100 uL 넣어주고 냉장고에서 2시간동안 반응시켰다. 이렇게 EDC/NHS 반응을 통하여 연결된 MoS₂와 DNA의 확인은 TBE Native 전기영동을 통하여 확인하였다.

[0088] **2-4. 세포막 내 고정화를 확인**

[0089] 도입된 RGD 펩타이드를 통한 세포막 내 고정화를 확인하였다. 이를 위하여 제작된 단백질/DNA 복합체에 양쪽에 아민기를 가진 상보적인 DNA를 붙여주고, 마지막으로 RGD 펩타이드를 EDC/NHS 반응으로 상보적인 DNA의 아민기에 결합시켰다. 이렇게 만들어진 복합물질을 세포에 넣어준 뒤에, 복합물질의 세포막 내 결합을 콘포칼 현미경을 이용하여 확인하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0091] **2-5. 결과**

[0092] 도 3에서확인할 수 있듯이, 셀레트론을 구성하는 요소들의 제작 및 기능 확인 결과를 보여준다. TEM 이미지는 합성된 카르복실기가 도입된 MoS₂의 제작 결과를 보여주며, EDX 분석을 통하여 Mo, S, 그리고 카르복실기의 O 원소가 나오므로 성분 분석을 하였다. 그 뒤 합성된 MoS₂의 세포 내 독성 테스트를 진행한 결과를 콘포칼 이미지와 MTT로 확인하였다. 콘포칼 이미지에는 세포 내로 투입된 MoS₂ 입자를 확인 가능하며, MTT 결과 0.2 mg/mL 농도의 입자량까지는 세포 내 투입 후 48시간 후까지 세포의 활성이 잘 유지됨을 확인할 수 있었다. 그 뒤, 단백질/DNA 복합체의 제작을 전기영동을 통하여 확인하였다. DNA만 있는 경우의 라인과 비교하여 더 높은 곳에 밴드가 형성됨을 통하여 복합체의 제작을 확인할 수 있었다. MoS₂와 상보적인 DNA 가닥의 EDC/NHS를 통한 연결 역시 전기영동을 통하여 더 높은 곳에 복합체의 밴드가 나타남을 통하여 확인 가능하였다. 마지막으로 단백질에 연결된 두가닥의 DNA 중 단백질에 직접 붙지 않는 상보적인 DNA 가닥에 연결되는 RGD 펩타이드를 통한 단백질/DNA 복합체의 세포막의 부착을 확인하였다. 단백질에 재조합으로 도입된 시스테인 기에 말레이미드기가 있는 texasred 형광을 붙여서 콘포칼로 확인 결과, 세포막을 따라 texasred의 붉은 형광이 나타남을 통하여 RGD 펩타이드를 통한 세포막내 고정화 기능을 확인할 수 있었다.

[0094] **실시예 3. 셀레트론의 제작 확인**

[0095] 셀레트론의 기관 상 고정화는 냉장고에서 각 스텝 별로 3시간의 반응시간을 두면서 진행되었으며, RGD 펩타이드의 고정화 과정만 1시간동안 진행되었다. 도 2의 과정대로 고정화를 진행하였다. 셀레트론의 제작 및 기관 상 고정화의 확인은 전기영동과 SEM (Scanning electron microscopy) 그리고 STM (Scanning tunneling microscopy)로 진행하였다. 셀레트론의 제작은 도 4에 나타내었다. CPP의 경우, 아주 작고 실질적으로 STM 또는 SEM으로 확인이 어려워, 셀레트론의 제작 확인은 단백질/DNA/MoS₂까지 제작한 뒤 진행하였다. 도 4는 셀레트론의 제작 및 기관 상 고정화를 확인한 결과이다. 전기영동 실험을 통하여, DNA만 있는 라인, 단백질/DNA 복합체

만 있는 라인과 비교하여, 단백질/DNA/MoS₂의 경우 크기와 무게가 더 증가하고 그에 따라서 더 높은 위치에 밴드가 나타남을 통하여, 단백질/DNA/MoS₂ 복합체가 만들어짐을 확인하였다. 그 뒤 기관 상에 만들어진 단백질/DNA/MoS₂의 결과를 SEM을 통하여 확인 가능하였다. 마지막으로 STM으로 확인결과, 예상되었던 단백질/DNA/MoS₂의 높이 20 nm와 유사한 높이를 가지는 복합물질이 기관 상에 고정화되어 있음을 확인함으로써 셀레트론의 기관 상 고정화를 확인 가능하였다.

[0097] **실시예 4. 셀레트론의 세포 투과와 간접적인 확인**

[0098] 셀레트론의 세포 내 절반 투과 여부는 간접적으로 형광물질을 도입하여 확인할 수 있었다. 도 5는 셀레트론의 세포 내 절반 투과가 가능한지를 확인하는 실험 과정의 이미지이다. 이를 위하여 셀레트론을 기관이 아닌 액체 상태에서 제작을 하였다. 단백질 부분의 제조합 시스템인 부분에 말레이미드가 있는 texasred 형광을 붙였고, 맨 위쪽에 있는 MoS₂ 부분에 EDC/NHS 반응이 없이 정전기적 인력으로 아민기가 달린 FITC 형광물질을 붙였다. 이 반응 과정들은 모두 냉장고에서 3시간 동안 반응시켰다. 이렇게 두 가지 형광물질이 달린 셀레트론을 세포 내 투입시 아래 이미지처럼 RGD 펩타이드로 인하여 세포막에 고정화가 되어 texasred의 붉은 형광은 세포막 부근에 나타나며, 세포 내부로 침투되는 MoS₂에 있는 녹색 형광은 정전기적 인력 결합이 세포 내부에서 끊어지는 원리를 통하여, 세포 안팎으로 퍼져나가는 결과를 얻을 수 있고, 이에 따라 세포 내 셀레트론의 절반 침투를 확인할 수 있을 것이라 판단하였다. 두 가지 형광물질이 고정화되어 만들어진 셀레트론의 세포 내 절반 투과의 실험 결과는 도 6에서 확인 가능하다.

[0099] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 두 가지 형광물질이 붙은 셀레트론을 콘포칼로 확인하였다. 녹색과 붉은색이 중첩되어 있음을 확인 가능하였다. 그 뒤, 이 셀레트론을 세포에 주입 후 결과를 보면, 오른쪽 이미지와 같이, 붉은 형광은 세포막 부근에 위치하고, 녹색 형광은 세포 안팎으로 퍼져 나가 세포 부근에 잘 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 마지막 데이터는 왼쪽에 있는 이미지와 같이 기관 상에 셀레트론을 고정화 한 뒤에 맨 위쪽에 녹색 형광물질만 고정화 한 뒤에 세포를 그 위에 키운 결과이다. 3차원 수직 콘포칼 이미지를 보면 MoS₂에 붙은 녹색 형광이 세포 내부에 위치함을 확인할 수 있고, 이를 통하여 기관 상에 제작된 셀레트론의 세포 내부 침투를 확인할 가능하였다. 모든 콘포칼 이미지의 세포 핵 염색에는 Hoechst 33342 물질을 이용한 푸른 염색이 적용되었다.

[0101] **실시예 5. 메모리 소자 응용을 위한 패턴칩의 제작 및 셀레트론과 세포의 고정화 확인**

[0102] 그 뒤 셀레트론을 이용한 세포 내부 전하상태 제어 및 세포의 전기화학 신호 측정을 위한 패턴칩을 제작하였다. 패턴칩을 제작한 이유는 '셀레트론 내 전압을 인가하는 세트'와 '세포 내 전기화학 신호를 측정하는 세트'가 서로 독립적으로 작동될 수 있도록 하기 위해서였다. 이를 위하여 셀레트론은 특이적으로 '셀레트론 내 전압을 인가하는 세트'에만 고정화되고, '세포 내 전기화학 신호를 측정하는 세트'에는 셀레트론이 고정화되지 않게 하고자 하였다. 도 7은 세포 내부 전하상태 제어 구현 및 신호 측정을 위하여 제작된 패턴칩의 도면 및 이미지를 보여준다. CAD 디자인 결과는 서로 다른 두 전극이 단순화된 이미지처럼 서로 간섭하지 않게 패턴되어 있음을 확인할 수 있으며, 두 세트가 서로 독립적으로 작동될 수 있도록 하기 위해서였다. 만들어진 패턴칩의 SEM 결과를 통하여 패턴의 제작을 확인할 수 있었고 패턴 기관 전체의 이미지는 아래와 같다.

[0103] 그 뒤에 제작된 패턴칩 상에 셀레트론의 고정화를 진행하였다. 패턴칩 전체 면적에 셀레트론의 고정화를 진행하였다. 그 뒤에 전압을 인가하는 세트를 구성하는 라인에만 셀레트론이 고정화될 수 있도록 세포 내 신호를 측정하는 세트의 라인에는 1 V 이상의 고전압을 걸어주어 골드-셀룰로오스 결합을 끊어 고정화된 셀레트론을 전부 제거하였다. 이를 통하여 세포 내 투입된 셀레트론에 전압을 인가하는 세트의 라인에만 셀레트론이 고정되어 있도록 하였다. 이 결과는 SEM을 이용하여 확인할 수 있었고, 인접한 두 라인 중 한 라인에만 셀레트론이 고정화되어 있음을 통하여 확인 가능하였다. 그 뒤, 셀레트론이 고정화된 패턴칩 위에 세포를 키운 결과를 SEM으로 확인하였다. 이 결과들은 도 8에서 확인 가능하다. 이와 같이 패턴칩 상에 셀레트론을 고정화하고 세포를 키우게 되면 도 8의 오른쪽에 위치하는 이미지에서 볼 수 있듯이 세포 내 침투한 셀레트론에 전압 인가 여부에 따라서 세포의 전기화학 신호가 다르게 변화하여 측정될 것으로 예측하였다.

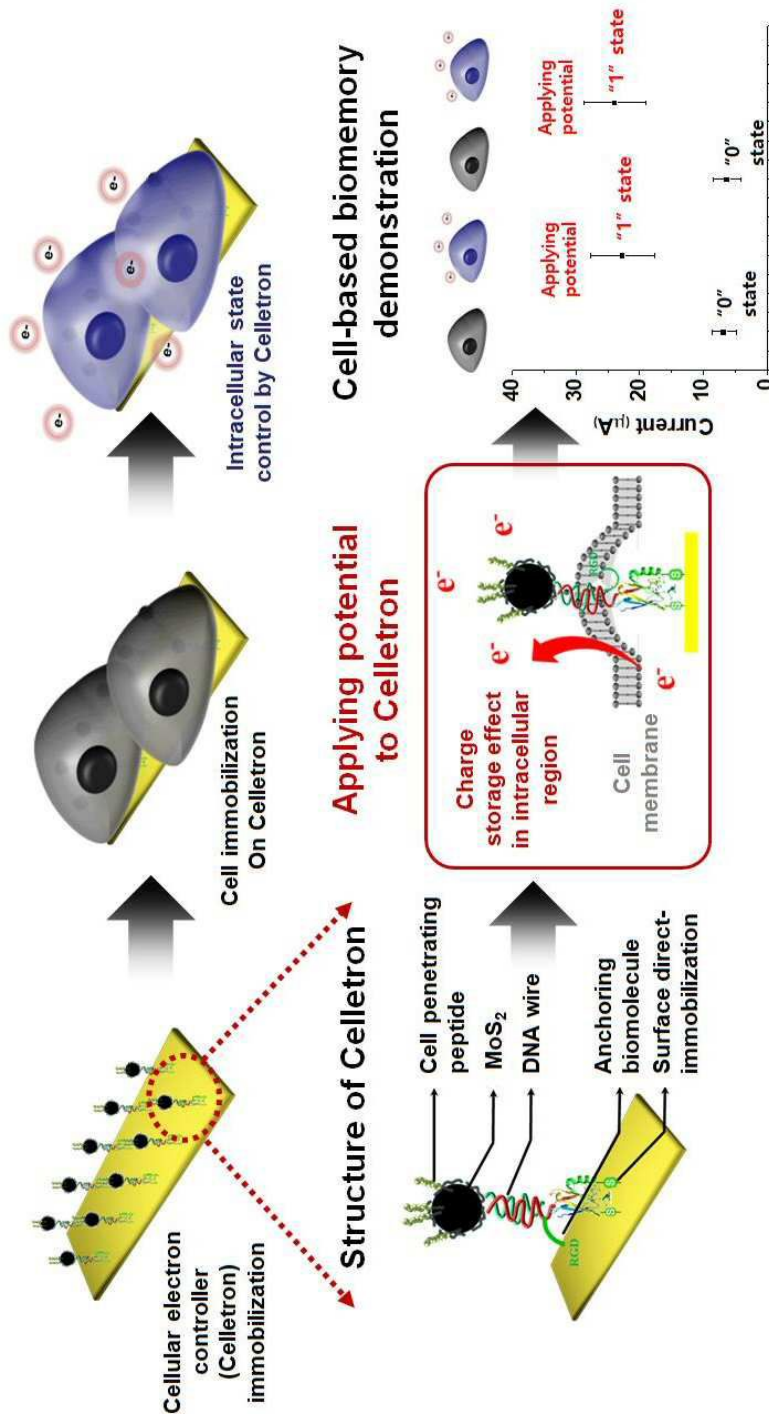
[0105] **실시예 6. 셀레트론을 이용한 세포 기반 메모리 소자 기능 확인**

[0106] 실시예 5에서 만들어진 세포가 자란 셀레트론이 고정화된 패턴칩 상에 두 개의 독립적인 전기화학 시스템을 도입하여 세포 내 전하상태 제어 및 전기화학 신호 제어를 구현하였다. 셀레트론의 효과를 확인하기 위하여, 비교 실험으로 셀레트론이 고정화되지 않은 패턴칩에 자란 세포에도 전압인가 및 신호측정 실험을 진행하였다. 도 9는 셀레트론이 고정화된 패턴칩 위에 세포를 키운 뒤에, 세포 내 침투한 셀레트론에 전압 인가 여부에 따른 제어된 세포의 전기화학 신호 (Chronoamperometry) 결과를 보여준다. 셀레트론이 없이 세포만 있는 패턴칩의

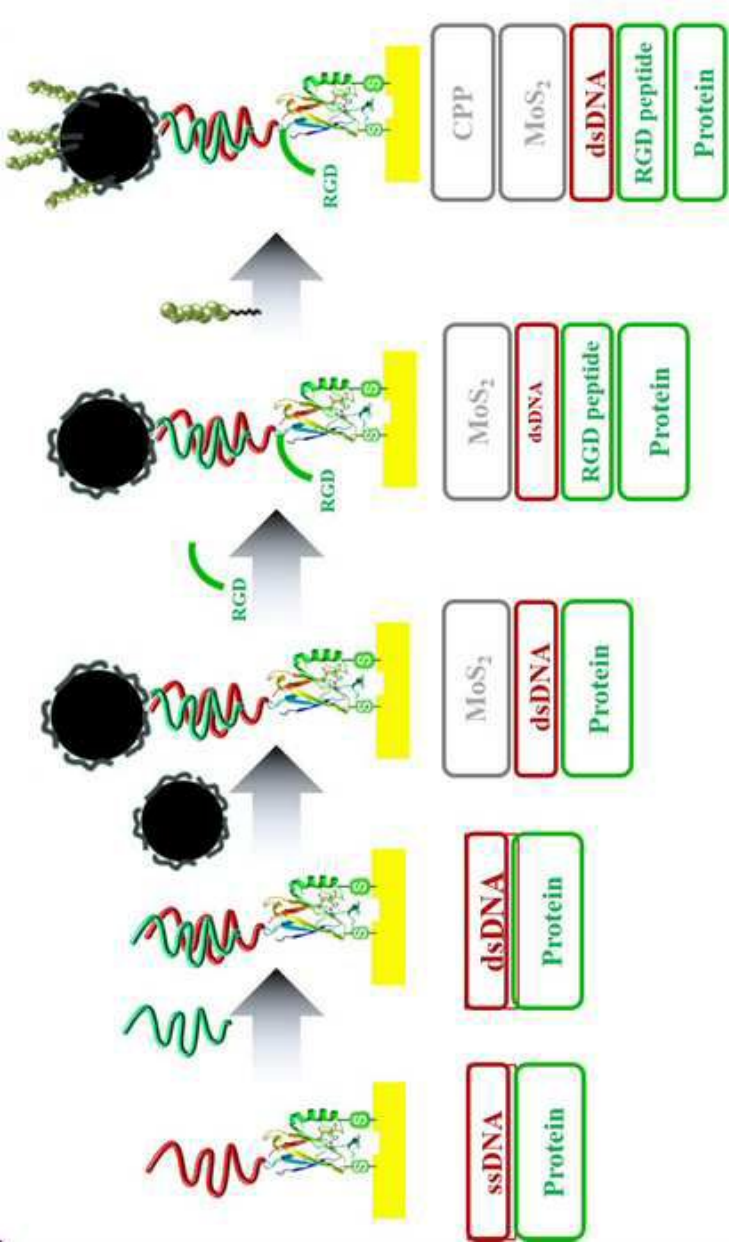
경우, 축전효과가 없어, 전압을 인가하기 전후의 결과가 유사함을 확인하였다. 이에 비해, 셀레트론이 고정화된 패터칩 상에 자란 세포는 전압 인가 전후의 결과가 확연히 다를 수 있었고, 이는 세포 내 도입된 셀레트론의 축전효과로 인하여 세포 내 전하상태가 제어되어 나타난 결과이다. 또한, 이 같은 세포 내 전하상태 제어를 통한 세포의 전기화학 신호 제어는 아래 결과와 같이 반복적으로 두가지 상태로 구현 가능하였으며, 이는 세포 기반 메모리 소자의 가능성을 보여준다.

도면

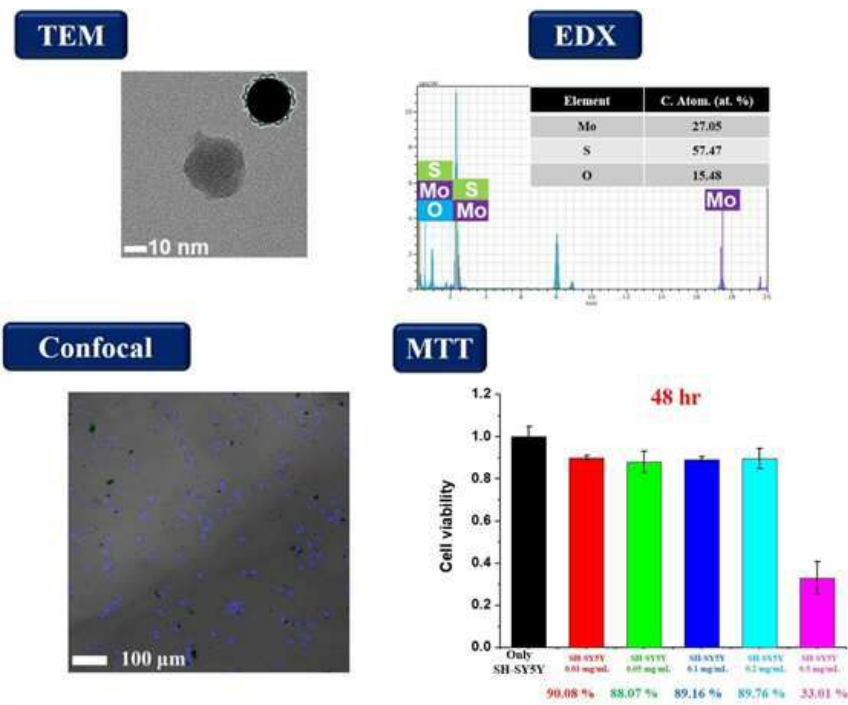
도면1



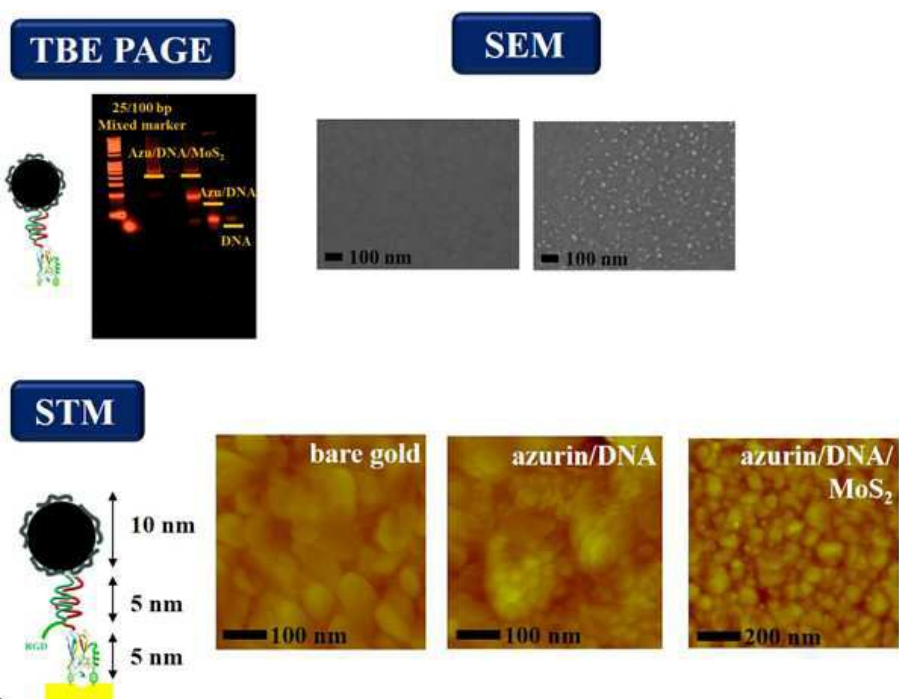
도면2



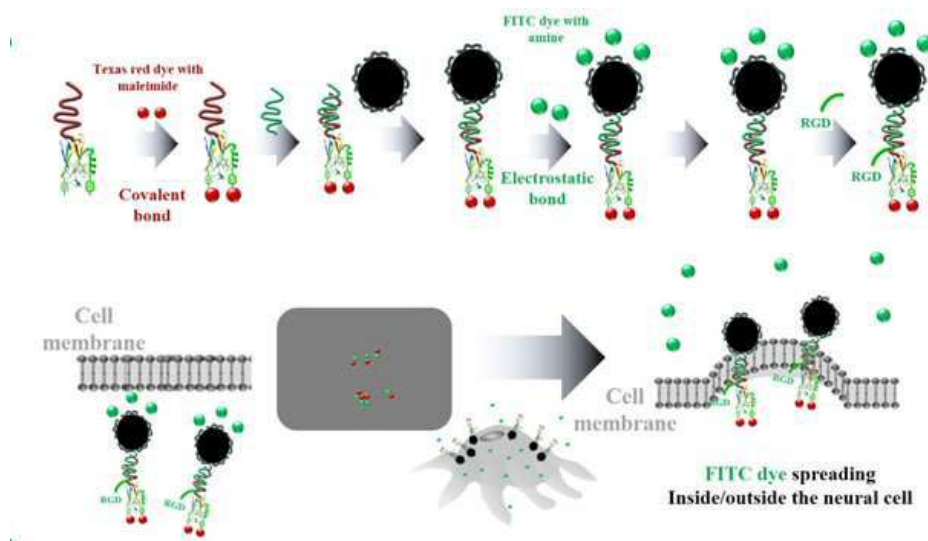
도면3



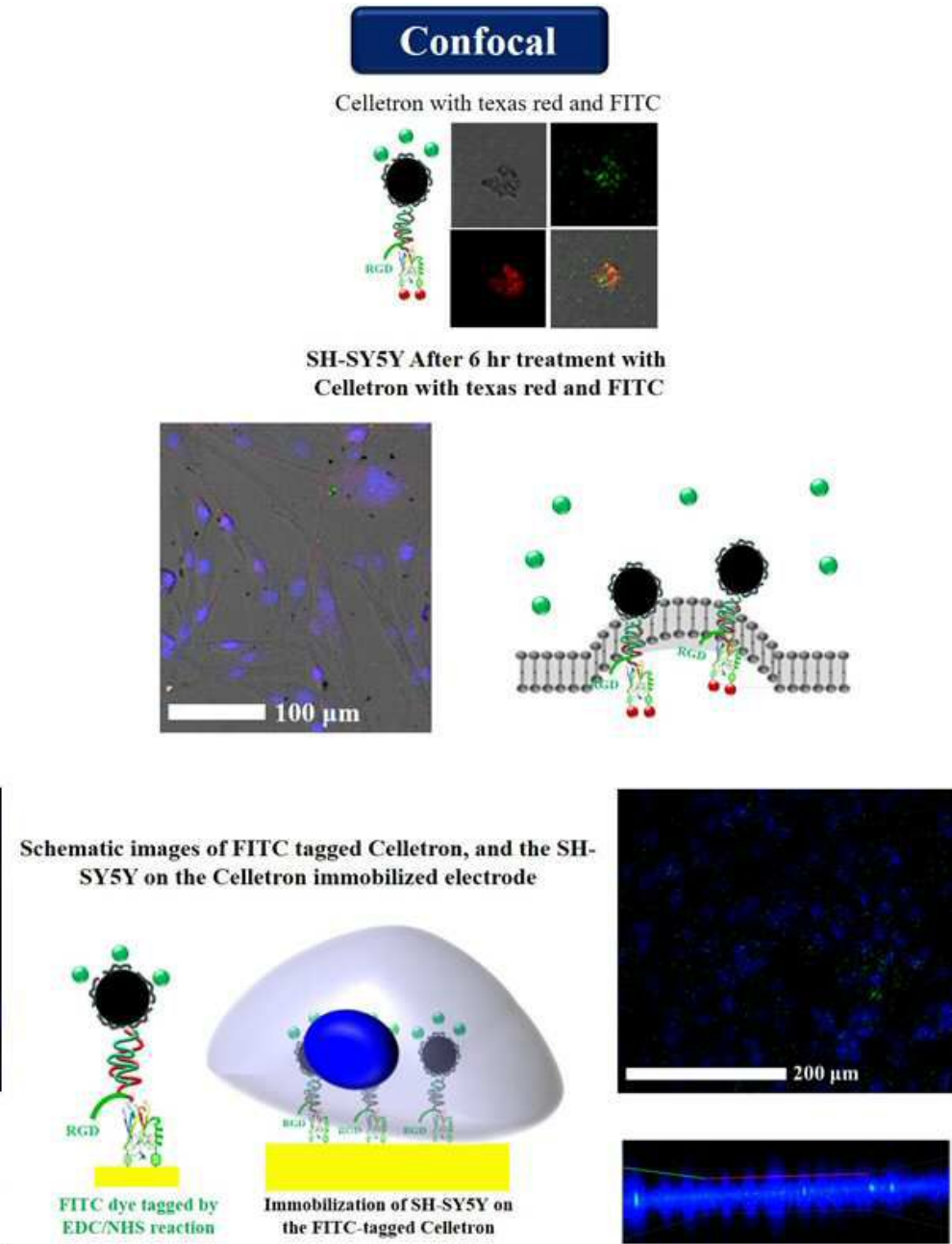
도면4



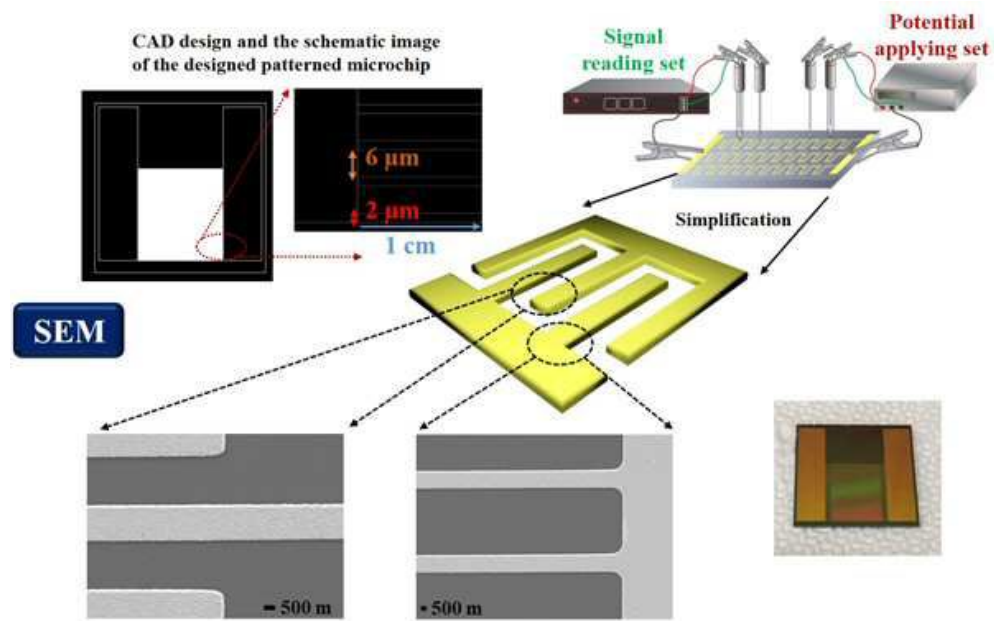
도면5



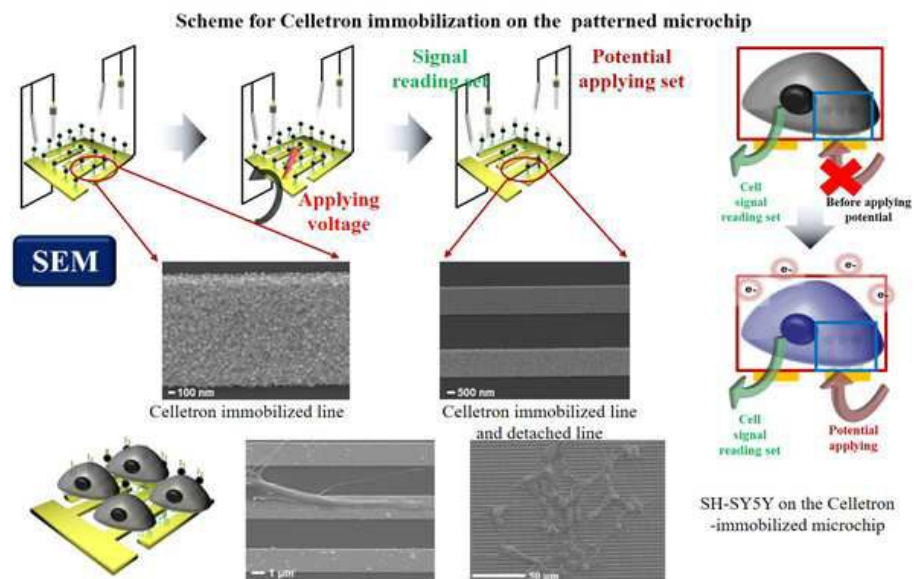
도면6



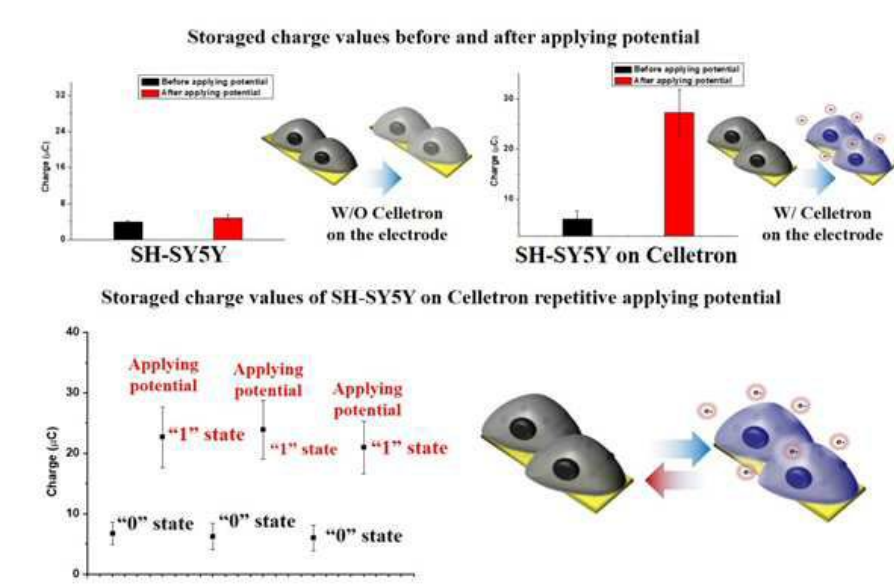
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
- <120> Celletron for control of internal charge state and electrochemical signal control and measurement method using the cell
- <130> PN180395
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Linker DNA
- <400> 1
- aaaaatcaaa aaaccccccc cccccccc
- <210> 2
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Complementary DNA
- <400> 2

aaataaaaag gggggggggg ggggggggtt

29

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RGD

<400> 3

Arg Gly Asp

1

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CPP

<400> 4

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln

1

5

10