



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0003617

(43) 공개일자 2015년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0076712

(22) 출원일자 2013년07월01일

심사청구일자 2013년07월01일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

최정우

서울특별시 용산구 한강로 3가 63-389(2/9) 용산 시티파크 103-603

이택

서울 동작구 상도로53길 8, 316동 1403호 (상도동, 래미안상도3차아파트)

민준홍

서울 동작구 흑석로 84, (흑석동, 중앙대학교)

(74) 대리인

양부현

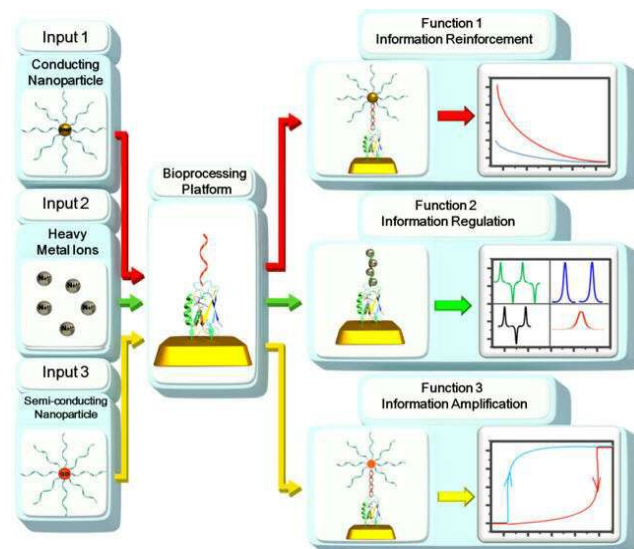
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 바이오 프로세싱 장치

(57) 요약

본 발명은 (a) 산화환원능(redox potential)을 갖는 단백질; 및 (b) 상기 단백질에 결합된 단일가닥 DNA(ssDNA)의 혼성체를 포함하는 바이오 프로세싱 장치를 제공한다. 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 정보 강화(information reinforcement), 정보 조절(information regulation) 또는 정보 증폭(information amplification) 기능을 갖는다. 이러한 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 다양한 기능의 수행이 가능한 바이오컴퓨팅 시스템의 새로운 개념을 제시한다.

대표도 - 도3a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201332001

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 인터페이스 기술개발사업

연구과제명 생물분자로 구성된 바이오전자소자 기술개발

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201331005

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견 연구자 지원사업

연구과제명 나노신경줄기세포 전자칩 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 산화환원능(redox potential)을 갖는 단백질; 및 (b) 상기 단백질에 결합된 단일가닥 DNA(ssDNA)의 혼성체를 포함하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 재조합 단백질로, 시스테인 잔기가 도입되어 기관에 직접 고정화 되는 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단백질은 금속단백질인 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 ssDNA는 티올기(thiol group)가 도입되어 링커를 통해 상기 산화환원능을 갖는 단백질과 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 링커는 SMCC(Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate), 포름알데하이드(formaldehyde), EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride 또는 BASED(bis[beta-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide), BMH(bis-maleimido-hexane)인 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 ssDNA는 20-100 mer의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 바이오 프로세싱 장치는 환원 전위 및 산화 전위의 인가에 의해 작동되는 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 바이오 프로세싱 장치는 전도성 나노입자, 반도체(semi-conducting) 나노입자 또는 중금속 이온을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 9

제 1 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 나노입자는 상기 ssDNA에 상보적인 서열을 갖는 DNA 서열이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 중금속 이온은 상기 ssDNA에 이온 결합하는 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 바이오 프로세싱 장치는 정보 강화(information reinforcement), 정보 조절(information regulation) 또는 정보 증폭(information amplification) 기능을 갖는 것을 특징으로 하는 바이오 프로세싱 장치.

청구항 12

다음 단계를 포함하는 바이오 프로세싱 장치의 제조방법:

- (a) 산화환원능을 갖는 단백질을 ssDNA와 결합하여 혼성체를 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 혼성체를 기판에 고정시키는 단계.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 재조합 단백질로, 시스테인 잔기가 도입되어 기판에 직접 고정화 되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 단백질은 금속단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 12 항에 있어서, 상기 ssDNA는 티올기(thiol group)가 도입되어 링커를 통해 상기 산화환원능을 갖는 단백질과 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 링커는 SMCC(Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate), 포름알데하이드(formaldehyde), EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride 또는 BASED(bis[beta-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide), BMH(bis-maleimido-hexane)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 12 항에 있어서, 상기 ssDNA는 20-100 mer의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 12 항에 있어서, 상기 혼성체는 다음의 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) ssDNA에 티올기를 도입하여 티올-변형 ssDNA를 제조하는 단계;
- (b) 상기 티올-변형 ssDNA를 링커와 반응하여 티올-변형 ssDNA-링커를 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 티올-변형 ssDNA-링커와 산화환원능을 갖는 단백질을 결합하는 단계.

청구항 19

제 12 항에 있어서, 상기 바이오 프로세싱 장치는 환원 전위 및 산화 전위의 인가에 의해 작동되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 12 항에 있어서, 상기 바이오 프로세싱 장치는 전도성 나노입자, 반도체(semi-conducting) 나노입자 또는 중금속 이온을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 나노입자는 상기 ssDNA에 상보적인 서열을 갖는 DNA 서열이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 20 항에 있어서, 상기 중금속 이온은 상기 ssDNA에 이온 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 20 항에 있어서, 상기 바이오 프로세싱 장치는 정보 강화(information reinforcement), 정보 조절(information regulation) 또는 정보 증폭(information amplification) 기능을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 바이오 프로세싱 장치에 관한 것이다.

배경기술

반도체 산업은 빠르게 성장해왔지만, 전자 장치의 최소화는 부품의 통합, 열, 장치의 수명 단축 및 효율성과 같은 기술적, 물리적 한계에 도달하였다. 이러한 한계를 극복할 수 있는 분자 전자 장치는 분자 수준의 크기 조절, 제작이 가능하며 실리콘-기반 장치의 기능을 모사할 수 있다.

최근 몇 년 동안, 분자 논리 게이트 및 컴퓨터를 사용한 장치, 특히 바이오프로세싱 시스템의 인식에 대한 효소가 갖는 특성을 모방하여 생체분자 정보 프로세싱 시스템을 개발하는데 많은 관심을 받아왔다. 회로 개발 및 스케일업의 복잡성으로 인한 어려움은 생체분자 시스템의 적용으로 쉽게 해결될 수 있다. 프로세싱 작동은 용액 내 또는 기능화된 인터페이스 상의 생화학 반응에 의해 수행된다. 지난 10년 동안, 본 발명자들은 '생체

분자를 기반으로 한 정보 저장 장치'에 초점을 맞춰 연구하였다. 이전의 연구는 금속단백질-기반 바이오메모리 장치를 이용하여 정보의 저장, 읽기 및 리셋과 같은 기본적인 기억 기능에 대한 것이었다. 또한, 2 종류의 다른 금속단백질을 연결하여 전기화학적 바이오메모리를 기반으로 한 단백질의 다단계 저장 기능을 보여주었고, 실리콘-기반 메모리 장치의 한계를 극복하기 위해 다양한 기능을 갖는 바이오메모리 장치를 개발하였다. 그러나, 이러한 이전의 연구는 단지 기본적인 정보 저장 기능만을 보여주었고, 단순한 기능성으로 인해 분자-기반 컴퓨팅을 수행하기 어려웠다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다. 대안으로, 현재의 분자 전자장치는 실리콘-기반 전자 장치로 적합하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 분자 전자 장치의 한계를 극복한 바이오프로세싱 장치를 개발하기 위해 노력하였다. 그 결과, 단순 금속단백질을 갖는 바이오 메모리 장치로부터 단일 혼성체 분자를 갖으며 “정보 강화”, “정보 조절” 및 “정보 증폭”과 같은 다양한 기능의 수행이 가능한 새로운 바이오 프로세싱 장치를 최초로 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 발명의 목적은 바이오 프로세싱 장치를 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 바이오 프로세싱 장치의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 산화환원능(redox potential)을 갖는 단백질; 및 (b) 상기 단백질에 결합된 단일가닥 DNA(ssDNA)의 혼성체를 포함하는 바이오 프로세싱 장치를 제공한다.

[0010] 본 발명자들은 분자 전자 장치의 한계를 극복한 바이오프로세싱 장치를 개발하기 위해 노력하였다. 그 결과, 산화환원능을 갖는 단백질 및 상기 단백질에 결합된 단백질 혼성체를 포함하는 바이오 프로세싱을 단순 금속단백질을 갖는 바이오 메모리 장치로부터 단일 혼성체 분자를 갖으며 “정보 강화”, “정보 조절” 및 “정보 증폭”과 같은 다양한 기능을 수행이 가능한 새로운 바이오 프로세싱 장치를 최초로 개발하였다.

[0011] 본 발명의 주요한 특징은 플랫폼 모듈(platform module)로 기능하는 상기 산화환원능을 갖는 단백질 및 신호 수용체 모듈(signal receptor module)로 기능하는 상기 ssDNA의 혼성체를 포함하는 것이다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 재조합 단백질로, 시스템인 잔기가 도입되어 기관에 직접 고정화 된다.

[0013] 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 시스템인 잔기가 도입되어 기관에 자기-조립(self-assembly)되어 직접 고정화 된다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질은 금속단백질이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 금속단백질은 아주린, 헤모글로빈, 미오글로빈, 헤메리트린, 혈색소, 시토크롬, 철-황단백질, 루브레독신, 플라스토시아닌, 페리틴, 셀룰로프라스민, 탄산 탈수 효소, 비타민 B₁₂-종속 효소, 니트로게나아제, 슈퍼옥사이드 디스무타제, 엽록소-포함 단백질, 칼모듈린, 글루코스-6-포스파타제, 헥소키나아제, DNA 폴리메라아제, 바나빈, 아르

기나아제, 카탈라아제, 수소화 효소, 철반응요소결합단백질, 아코니타제, 우레아제, 시토크롬 산화 효소, 라케이스, 알코올 탈수소 효소, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제, β -아밀로이드단백질, 질산 환원 효소, 글루타티온과산화효소, 메탈로티오네인 또는 포스파타아제이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 금속단백질은 아주린이다.

[0015] 보다 상세하게는, 상기 아주린은 산화환원능을 갖는 단백질로, 미생물 유래[예컨대, 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)]의 아주린을 부위특이적 돌연변이(site-specific mutagenesis)를 유도하여 시스테인 잔기[예컨대, Lys92Cys(K92C)]가 도입되어 이황화 결합(disulfide bond)을 통해 금 기관 상에 직접적으로 고정된다.

[0016] 본 발명의 상기 혼성체를 구성하는 ssDNA는 상기 산화환원능을 갖는 단백질과 간접적으로 결합한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 ssDNA는 티올기(thiol group)가 도입되어 링커를 통해 상기 산화환원능을 갖는 단백질과 결합된다. 본 발명의 상기 링커는 단백질을 DNA와 결합할 수 있는 당업계의 어떠한 링커를 포함한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 링커는 SMCC(Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate), 포름알데하이드(formaldehyde), EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride 또는 BASED(bis[beta-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide), BMH(bis-maleimido)hexane)이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 링커는 SMCC이다.

[0018] 본 발명의 상기 혼성체는 다음의 다양한 방법으로 제조될 수 있다:

[0019] (1) 산화환원능을 갖는 단백질의 아미노기를 링커(예컨대, sulfo-SMCC)와 반응하여 아마이드 결합을 형성하고 티올-변형 ssDNA(설프히드릴-함유 생체분자)를 첨가하여 재조합 아주린-링커의 말레이미드기와 반응시켜 티올에 스터 결합을 형성하여 재조합 아주린-ssDNA 혼성체를 제조한다.

[0020] (2) 티올-변형 ssDNA(설프히드릴-함유 생체분자)를 링커와 반응한다. 산화환원능을 갖는 단백질을 티올-변형 ssDNA-링커에 첨가하여 아민 결합을 형성하여 산화환원능을 갖는 단백질-ssDNA 혼성체를 제조한다.

[0021] (3) 아민-변형 ssDNA를 링커와 반응하여 아마이드 결합을 형성한다. 아주린 분자의 시스테인 잔기를 환원시키기 위해 DTT를 처리하여 산화환원능을 갖는 단백질을 제조한다. 상기 산화환원능을 갖는 단백질을 아민-변형 ssDNA-링커와 반응하여 티오에스터 본드를 형성하여 산화환원능을 갖는 단백질-ssDNA 혼성체를 제조한다.

[0022] (4) 산화환원능을 갖는 단백질 분자의 시스테인 잔기를 환원시키기 위해 DTT를 처리한다. 산화환원능을 갖는 단백질을 링커와 반응시켜 티오에스터 결합을 형성한다. 아민-변형 ssDNA를 첨가하여 산화환원능을 갖는 단백질-ssDNA 혼성체를 제조한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 (2) 방법을 통해 상기 혼성체를 제조한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 ssDNA는 20-100 mer의 길이를 갖는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 ssDNA는 30-70 mer의 길이를 갖고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 ssDNA는 40-60 mer의 길이를 갖는다.

[0025] 본 발명의 상기 혼성체는 산화환원능을 갖는 단백질의 시스테인 잔기를 통해 기관에 직접적으로 고정된다.

[0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 기관은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 기관은 금속 기관이고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 기관은 금(Au) 기관이다.

[0027] 본 발명의 바이오프로세싱 디바이스는 산화환원능을 갖는 단백질에 의해 특이적인 산화 전위 및 환원 전위를 갖는다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 바이오-메모리 디바이스는 환원 전위 및 산화 전위의 인가에 의해 작동된다.

[0029] 본 발명은 기관(예컨대, 금 기관)의 표면에 티올기, 즉 시스테인 잔기가 도입된 단백질 분자를 자기조립시키고, ssDNA를 단백질에 링커를 통해 결합한 바이오 프로세싱 장치는 인가되는 전압에 따라 나타나는

단백질 고유의 전자 전달 특성을 이용하여 나노 단위의 정보 저장 장치로 응용할 수 있음을 특징으로 한다.

[0030]

본 발명의 단백질 기반 바이오 프로세싱 장치가 전기적으로 작동되는 경우, 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 가역적으로 변화되고 전기적으로 읽을 수 있는(readable) 전기적 장치로서, 다음과 같이 구성될 수 있다. 이 전기적 장치는 기관을 포함한다. 이 기관은 상술한 바와 같으며, 하기의 실시예에서는 전기적으로 대전되는 금 표면 코팅된 기관이다. 상기 기관 상에 산화환원-활성층(redox-active layer)이 이루어진다. 본 발명에서는 산화환원 활성층으로서, 산화환원능을 가지는 시스템인 도입된 재조합 단백질의 SAM이 이용된다. 상기 산화환원 활성층은 재조합 단백질에 의해 일정한 전자적 상태, 예컨대 산화상태 또는 환원상태에 놓이게 된다. 상기 산화환원-활성층에 전극이 연결된다. 상기 기관또는 전극, 또는 기관과 전극 모두에 연결된 전기장원(electric field source), 예컨대 전압공급 유닛이 본 발명의 장치에 포함된다. 이 전기장원에 의해 공급된 전압 또는 전자빔에 의해 전자의 흐름이 유도되며, 이에 의해 메모리 특성을 나타낸다.

[0031]

따라서 전기적으로 본 발명의 메모리 디바이스를 구축하는 경우, 본 발명의 디바이스는 (i) 기관, (ii) 산화환원-활성층으로서 상기 기관 상에 고정화 되어 있고 산화환원능을 가지는 시스템인 도입된 재조합 단백질의 SAM, (iii) 상기 산화환원-활성층에 연결된 전극, 및 (iv) 상기 기관 및/또는 전극에 전압 또는 전자빔을 공급하는 전기장원(electric field source)을 포함한다.

[0032]

한편, 본 발명의 바이오-메모리 디바이스를 전기화학적으로 구현하는 구체적인 실시예를 참조하여 설명하면 다음과 같다:

[0033]

본 발명은 전기화학적 방법으로 인가(applying) 전압을 조절, 고정된 단백질의 산화와 환원 상태를 변화시키는 것이 가능한 정보 저장 디바이스에 관한 것이다. 단백질 박막이 형성된 기관은 전해질 용액, 예컨대 HEPES 전해질 안에 배치된다. 기관은 작업 전극으로 포텐티오스택에 연결되어 작동하고 전해질 안에 레퍼런스 전극(예컨대, Ag/AgCl)과 카운터 전극(예컨대, Pt)가 삽입된다. 레퍼런스 전극은 포텐티오스택이 전압을 스윙하는 경우 작업 전극의 전위 변화를 읽어내는 기준이 된다. 카운터 전극은 포텐티오스택의 전위 조절에 의해 전자가 흐르게 되는 통로다. 이와 같은 3 전극 시스템은 전기화학에서 가장 많이 구성하는 시스템 중의 하나인 것으로 알려져 있다. 상기 간단한 전기화학 시스템에서 순환전류전압법을 통해 간단한 전압-전류 곡선을 얻는다. 개회로 전위란 아무런 전압을 가하지 않은, 일종의 회로가 끊어져 있는 상태에서 단백질 박막의 고유 특성과 전해질의 고유 특성에 의해 일정 전위 차가 형성되게 되고 구성된 시스템이 자연적으로 평형에 이르는 특정 전위를 가지게 된다는 것을 의미한다. 상기 원리를 역으로 이용하면 한 시스템의 개회로 전위를 알고 있을 때 개회로 전위를 시스템에 인가하면 시스템을 인위적으로 평형 상태에 근접하게 만들 수 있게 된다. 이를 구체적으로 설명하면 단백질 박막에 특정 환원 전위가 인가되어 단백질이 전해질로부터 전자를 받아 환원 되었을 경우, 여기에 개회로 전위를 인가하면 단백질 박막이 본래의 자연적 평형 상태로 돌아가면서 흘러 들어갔던 여분의 전자를 내보내게 된다는 것을 의미한다. 반대로 단백질 박막이 전자를 내보내며 산화되었던 경우에 있어서도 개회로 전위가 인가되면 흘러나왔던 전자들이 다시 흘러 들어가면서 본래의 전위 상태로 돌아가게 된다. 즉 개회로 전위는 단백질 박막의 산화환원 상태를 읽어내는 역할을 하게 되는 것이다.

[0034]

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 바이오 프로세싱 장치는 전도성 나노입자, 반도체(semi-conducting) 나노입자 또는 중금속 이온을 추가적으로 포함한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 상기 ssDNA에 상보적인 서열을 갖는 DNA 서열이 결합되어 있어, 본 발명의 바이오 프로세싱 장치를 구성하는 ssDNA와 상보적으로 결합하고, 상기 중금속 이온은 상기 ssDNA에 이온 결합한다.

[0035]

본 발명의 바이오 프로세싱 장치가 전도성 나노입자를 포함하는 경우에, 정보 강화(information reinforcement) 기능을 나타낸다.

[0036]

본 명세서에서 언급된 용어 “정보 강화”는 종래의 바이오 메모리 장치와 비교하여 더 많은 전자를 저장할 수 있는 기능을 의미한다. 보다 상세하게는, 산화전위를 적용하는 경우에, 전위는 전자를 Azu/DNA 혼성체로부터 전극으로 이끌어 양성 전하가 저장되게 한다. 이러한 상태를 ‘쓰기’ 상태로 간주한다. 환원 전위의 적용은 전자전송의 Azu/DNA 혼성체의 유출을 생성할 수 있으며, 이러한 상태를 ‘지우기’ 상태로 간주한다. 산화전위 및 환원전위의 적용 및 전류 반응의 측정은 전기화학적 시스템의 저항-용량(resistance-capacitance; RC) 시간 상수에 의존적이다. 도 6b에서 볼 수 있듯이, 232 mV 산화전위 인가는 정량적으로 Azu/DNA 혼성체 층을 산화시켜(쓰기 상태) 결과적으로 혼성체에 양전하가 저장되고, 83 mV 환원전위 인가는 상기 혼성체 층을 원래 상태로 전환시킨다(지우기 상태). 환원전류는 산화전류와 동일한 규모를 갖는다. 도 6c는 232 mV의 산화전위 단계 및 83 mV의 환원 전위 단계의 전류 반응의 2가지 타입이 Azu/DNA 혼성체 층에 적용되어 종래의 바이오메모리 기능을 확인한 결과를 보여준다(도 6c; 점점 라인). 정보 강화의 기능은 종래의 바이오 메모리 기능과 유

사하다. 그러나, cDNA-GNP를 Azu/DNA 혼성체에 추가하는 경우에 전하 저장 능력은 종래의 바이오메모리와 비교하여 한정된 영역에서 극적으로 증대된다(도 6c; 보라 라인).

[0037] 본 발명의 바이오 프로세싱 장치가 중금속 이온을 포함하는 경우에, 정보 조절(information regulation) 기능을 나타낸다.

[0038] 본 명세서에서 언급된 용어 “정보 조절”은 입력 물질(예컨대, 중금속)에 의존적으로 다양한 전위를 평가할 수 있는 기능을 의미한다. 본 발명의 바이오 프로세싱 장치를 구성하는 ssDNA 암(arm)은 Cu, Zn, Ni, Co, Fe 및 Mn과 같은 다양한 중금속 이온에 결합할 수 있는 대전된 백본(backbone)을 갖는다. 상기 ssDNA는 금속 이온에 결합할 수 있는 4가지 잠재적 부위를 구성함을 보여주었다. 1) 음전하 전인산염 산소 원자; 2) 리보오스 히드록실기; 3) 염기쌍; 및 4) 고리밖(exocyclic) 염기 케톤기. 전하 전송동안 DNA와 중금속 이온의 상호작용은 전기화학적 신호를 조절하고 전송하는데 필수적인 역할을 한다. 따라서, 상기 ssDNA 암을 조절 수용체로 사용할 수 있고, 중금속이온과 같은 입력 물질을 조절 오퍼레이터로 간주할 수 있다. 입력물질을 적용하는 경우에, 입력물질 특이적인 산화 전위, 환원전위 및 조절 전류를 나타낸다. 이러한 정보 조절기능은 멀티-비트 바이오 메모리와 같은 적용 가능성을 제공한다.

[0039] 본 발명의 바이오 프로세싱 장치가 반도체(semi-conducting) 나노입자를 포함하는 경우에, 정보 증폭(information amplification) 기능을 나타낸다.

[0040] 본 명세서에서 언급된 용어 “정보 증폭”은 본 발명의 바이오 프로세싱 장치가 고상-상태 바이오횼랜지스터(solid-state biotransistor)로 기능할 수 있음을 의미한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 산화환원능을 갖는 단백질(예컨대, 아주린)/ssDNA의 혼성체 접합 지점의 정전 용량(capacitance, C_1) 및 터널링 저항(tunneling resistance, R_1)은 STM 편향(V_s) 및 전류 세팅(I_s)의 조절에 의해 조절할 수 있는 팁 혼성체 거리를 변화시켜 용이하게 조작하여, C_1 값을 달리함으로써, 정전 용량 값, 정전 용량 비($V_1/V_2=C_2/C_1$)에 의해 결정되는 양 접합지점 간의 전압 분포에 의존적으로 단일 전자 충전 에너지(EC)를 변경할 수 있다. 따라서, 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 -0.5 내지 +0.5 V의 편향 전압을 인가하여 비저항 거동 및 다이오드와 같이 반응함을 보여준다(도 8b).

[0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 바이오 프로세싱 장치의 제조방법을 제공한다.

[0042] 본 발명의 방법은 상기 바이오 프로세싱 장치를 제조하는 방법으로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

[0043] 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 다양한 기능의 수행이 가능한 바이오컴퓨팅 시스템의 새로운 개념을 제시한다.

발명의 효과

[0044] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0045] (1) 본 발명은 바이오 프로세싱 장치 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0046] (2) 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 정보 강화(information reinforcement), 정보 조절(information regulation) 또는 정보 증폭(information amplification) 기능을 갖는다.

[0047] (3) 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 다양한 기능의 수행이 가능한 바이오컴퓨팅 시스템의 새로운 개념을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 제조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체를 제조하는 4가지 방법을 도식화하여 보여준다.

도 2a 내지 도 2c는 금 기판 표면에 고정화된 재조합 아주린(도 2a), 티올-변형 ss-DNA(도 2b) 및 재조합 아주린/DNA 혼성체(도 2c)의 표면 형태를 원자력현미경을 이용하여 확인한 결과를 보여준다.

도 3a 내지 도 3e는 재조합 아주린/DNA 혼성체의 특징을 보여준다. 도 3a는 바이오프로세싱 기작을 나타내고, 도 3b는 구조 및 기능을 나타내며, 도 3c는 바이오혼성체를 확인한 결과를 나타내고, 도 3d는 표면 형태를 나타내며, 도 3e는 표면 구성을 라만 분광기로 분석한 결과를 보여준다.

도 4a 내지 도 4c는 금 기판의 표면에 고정된 재조합 아주린(도 4a), 티올-변형 ssDNA(도 4b) 및 재조합 아주린/DNA 혼성체(도 4c)의 구성도 및 순환전압전류법 결과를 보여준다.

도 5a 내지 도 5e는 재조합 아주린/DNA 혼성체/Mn 이온(도 5a), 재조합 아주린/DNA 혼성체/Fe 이온(도 5b), 재조합 아주린/DNA 혼성체/Co 이온(도 5c), 재조합 아주린/DNA 혼성체/Zn 이온(도 5d), 재조합 아주린/DNA 혼성체/Ni 이온(도 5e) 및 재조합 아주린/DNA 혼성체/Cu 이온(도 5f)의 순환 전압전류법 결과를 보여준다.

도 6a 내지 도 6f는 재조합 아주린/DNA의 혼성체의 정보강화 기능을 보여준다. 도 6a는 1) Azu/DNA 혼성체 및 2) Azu/DNA-cDNA/GNP 혼성체의 CV 결과이고, 도 6b는 산화전위 또는 환원전위 인가에 따른 쓰기 또는 지우기 상태를 보여주며, 도 6c는 산화전위 및 환원 전위의 전류 반응의 2가지 타입이 Azu/DNA 혼성체 층에 적용되어 종래의 바이오메모리 기능을 확인한 결과를 보여준다. 도 6d 및 도 6e는 산화 전위, 환원 전위 및 이의 전류 응답에 대한 도식을 보여준다. 도 6f는 300 주기동안 유지 되는 정보 수행능력을 보여준다.

도 7a 내지 도 7d는 재조합 아주린/DNA의 혼성체의 정보 조절 기능을 보여준다. 도 7a는 혼성체의 ssDNA 암 (arm)에 Cu, Zn, Ni, Co, Fe 및 Mn과 같은 다양한 중금속 이온에 결합할 수 있는 대전된 백본(backbone)을 보여주고, 도 7b는 다양한 중금속 이온의 입력에 대한 산화전위, 환원전위 및 조절 전류를 나타내며, 도 7c는 중금속 이온과 같은 다양한 입력 물질을 추가한 경우의 Azu/DNA 혼성체의 전위 변동값을 보여주며, 도 7d는 중금속 이온의 입력에 따른 조절된 전류 변화를 나타낸다.

도 8a 내지 도 8d는 재조합 아주린/DNA의 혼성체의 정보 증폭 기능을 보여준다. 도 8a는 이중-장벽 터널-접합 (Double-Barrier Tunnel-Junction;) 배치 형태에서 Azu/DNA 혼성체를 통한 정보 증폭에 유용한 도구인 STS의 구성을 보여주며, 도 8b는 Azu/DNA 혼성체에 -0.5 내지 +0.5 V의 편향 전압을 인가하여 비저항 거동 및 다이오드와 같이 반응함을 보여준다. 도 8c는 전기적 쌍안정(electrical bistability)을 나타내는 -2.0 내지 +2.0 V 인가 하에 Azu/DNA-cDNA/QD 혼성체의 I-V 특성을 보여주고, 도 8d는 0-2-0 V 인가 하의 두 스위칭전압 방향을 갖는 STM의 Pt/Ir(백금/이리듐) 팁으로 측정된 Azu/DNA-cDNA/QD 혼성체 코어-셸 나노입자의 단층의 I-V 특성을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실험재료 및 실험방법

실험재료

공지된 방법을 통해 시스템인-변형 아주린을 발현 및 정제하였다(H. Song et al., 2011). 재조합 아주린 및 ssDNA 사이의 설포-SMCC를 통한 결합에 적합하도록 단일 가닥 DNA(5'-CCCCGGGAAAACCCGGGTTTCCCGGGAAAACCCGGGTTTCCCGGAAAAA-3')의 5' 말단에 티올기를 변형하였다. 전도성 나노입자와의 결합을 위해 상보적 ssDNA(5'-AACCAACCTTTT-3')을 제조하여 5' 말단의 티올기를 변형(티올-변형 상보적 ssDNA; 티올-cDNA)하였고, 스트렙타비딘 코팅된 CdSe-ZnS에 대하여 바이오틴이 부착된 cDNA를 제조하였다. 모든 변형된 ssDNA는 바이오니어(Bioneer, 대한민국)로부터 공급되었다. 금 나노입자(Gold Nanoparticle; GNP, 10 nm)는 BBI international(영국)에서 구매하였다. 스트렙타비딘-코팅된 콰텀 닷 (quantum dot, CdSe-ZnS, 625 nm)은 Invitrogen(미국)에서 구매하였다. 설포-SMCC(Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate), DTT(Dithiothreitol) 및 엘만스 시약(Ellman's reagent)은 Pierce(미국)에서 구매하였다. 황산 구리(II)(Cu₂SO₄), 염화코발트(II)(CoCl₂), 황산망간일수화물(MnSO₄·H₂O), 산화철(III)(Fe₂O₃), 염화니켈(NiCl₂), 황산아연(ZnSO₄), 에틸아세테이트, HEPES[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] 및 DMF(N,N-Dimethylformamide)는 Sigma Aldrich(미국)으로부터 구매하였다. 기판을 세척하기 위해 증류수 및 탈이온수를 사용하였다.

작동 전극으로, Au 기판(Au(200 nm)/Cr(2 nm)/SiO₂ 웨이퍼)을 G-mek(대한민국)에서 구매하여 라만 분광기, AFM 및 전기화학적 실험에 이용하였다. Pt 상대 전극 및 Ag/AgCl 기준 전극은 BAS(미국)에서 구매하였다.

- [0053] 슈도모나스 애크리노사 아주린의 유전적 조작
- [0054] 서브클로닝을 위해 이스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5 α를 사용하였다. 블루 쿠퍼 단백질 아주린을 코딩하는 유전자를 슈도모나스 애크리노사의 지놈 DNA로부터 PCR을 이용하여 증폭하였다. 정방향 프라이머는 Nco I 제한효소 사이트를 포함하며, 역방향 프라이머는 BamH I 제한효소 사이트를 포함하도록 디자인하였다. PCR 반응산물은 DNA 정제 키트(QIAZEN, 미국)를 이용하여 정제한 후, Nco I 및 BamH I(New England Biolabs, 영국)의 두 제한효소로 분해하였다. 분해된 DNA 프래그먼트를 미리 Nco I 및 BamH I 제한효소 처리한 pET-21a(+) 벡터(노바젠, 독일)에 라이게이션 키트(다카라, 일본)을 이용하여 라이게이션 하였다. Azu Cys F 및 Azu Cys R 프라이머는 부위특이적 돌연변이 유도되게 디자인하여, AA에서 TGC로 Lys92Cys(K92C)이 되도록 제조하였다. 부위특이적 돌연변이를 이용하여 아주린 유전자의 돌연변이 하였다.
- [0055] 재조합 아주린의 발현 및 정제
- [0056] 아주린 유전자를 포함하는 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 하였다. 형질전환주를 50 mg/ml 앰피실린을 포함하는 LB 배지 1 L가 든 셰이킹 플라스크에서 37℃로 OD 0.6까지 배양하였다. IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 최종 농도 0.839 mM이 되게 첨가하여 발현을 유도하였다. 형질전환된 세포를 37℃에서 16시간 동안 추가적으로 배양하였다. 5000 g로 4℃, 15분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 세포 페이스트를 수크로오스 버퍼(20% 수크로오스, 0.3 M Tris-HCl, pH 8.1 및 1 mM EDTA)에 부유하고, 삼투압 충격(0.5 mM MgCl₂)을 주었다. pH를 3.0까지 감소시켜 오염 단백질을 주변 세포질로부터 침전하여 아주린이 포함된 상층액을 수득하였다. 아포-아주린 및 시스테인-도입 아포-아주린 분획(각각의 일루션 pH= 4.6 및 4.8)을 pH 4.0-6.0의 농도구획(50 mM 초산나트륨)을 갖는 CM 셀룰로오스 이온-교환 컬럼으로 분리하였다.
- [0057] 재조합 Azurin-DNA 혼성체의 제조
- [0058] 재조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체를 고효율로 수득하기 위해 하기 4가지 결합 방법을 시도하였다(도 1).
- [0059] (1) 재조합 아주린의 아미노기를 설포-SMCC와 반응하여 아마이드 결합을 형성하고 티올-변형 ssDNA(설프히드릴-함유 생체분자)를 첨가하여 재조합 아주린-설포 SMCC의 말레이미드기와 반응시켜 안정한 티올에스터 결합을 형성하여 재조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체를 제조하였다.
- [0060] 보다 상세하게는, 5 μM×100 μl 재조합 아주린을 100 μM×200 μl 설포-SMCC와 6시간 동안 실온에서 혼합하였다. 설포-SMCC 태깅된 재조합 아주린을 정제하고 한외거르기(MWCO 3k Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, 미국)를 통해 비반응물을 제거하였다. 설포-SMCC 태깅된 재조합 아주린을 제조하는 동안, 50 μM 티올-변형 ssDNA 100 μl을 제조하였다. 티올-변형 ssDNA 활성화를 위해, 티올-변형 ssDNA에 20 mM DTT를 실온에서 30분 동안 처리하여 추가적으로 환원시켜 자유 설프히드릴기를 얻었다. 다음, DNA 용액에 100 μl 에틸아세테이트를 첨가하여 포화된 DTT를 제거하였다. 환원된 티올-변형 ssDNA를 탈염 컬럼(PD-10)을 이용하여 혼성용 완충액(20 mM Tris, 50 mM NaCl, 및 1 mM EDTA, pH 7.0)에 옮겼다. 다음, 티올-활성 ssDNA를 3시간 동안 실온에서 셰이커 반응한 후에 말레이미도-활성 설포-SMCC 태깅된 재조합 아주린과 반응시켰다. 설포-SMCC 태깅된 ssDNA를 정제하고 비반응 DNA, 재조합 아주린을 한외거르기를 통해 제거하였다. 0 내지 1 M의 연속 염화나트륨 농도구배를 갖는 S excellose 이온-교환 컬럼(Bioworks, 스웨덴)으로 재조합 아주린-SMCC-DNA를 정제하였다.
- [0061] (2) 티올-변형 ssDNA(설프히드릴-함유 생체분자)를 설포-SMCC와 반응하였다. 재조합 아주린을 티올-변형 ssDNA-설포 SMCC에 첨가하여 아민 결합을 형성하여 재조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체를 제조하였다.
- [0062] 보다 상세하게는, HEPES 완충액(pH 7.0)에 희석된 50 μM 티올-변형 ssDNA(52 mer) 100 μl을 준비하였다. 티올-변형 ssDNA 활성화를 위해, 티올-변형 ssDNA에 20 mM DTT를 실온에서 30분 동안 처리하여 추가적으로 환원시켜 자유 설프히드릴기를 얻었다. 다음, DNA 용액에 100 μl 에틸아세테이트를 첨가하여 포화된 DTT를 제거하였다. 환원된 티올-변형 ssDNA를 탈염 컬럼(PD-10)을 이용하여 혼성용 완충액(20 mM Tris, 50 mM NaCl, 및 1 mM EDTA, pH 7.0)에 옮겼다. 자유 SH-DNA를 제조하는 동안, DMF에 희석된 100 μM 설포-SMCC 200 μl을 제조하였다. 제조된 샘플을 컨쥬게이션하기 위해 6시간 동안 실온에서 셰이킹하였다. 다음, 설포-SMCC 태깅된 ssDNA를 정제하고 한외거르기(MWCO 3k Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, 미국)를 통해 비반응물을

제거하였다. 동일한 물 비의 재조합 아주린을 3시간 동안 실온에서 셰이커 반응한 후에 말레이미도-활성 설포-SMCC 태깅된 ssDNA와 반응하였다. 0 내지 1 M의 연속 염화나트륨 농도구배를 갖는 S excellose 이온-교환 컬럼(Bioworks, 스웨덴)으로 재조합 아주린-SMCC-DNA를 정제하였다. 정제된 단백질을 HEPES 완충액에 투석하였다. 수득한 재조합 아주린-SMCC-DNA를 반복 한외거르기(MWCO 3k Amicon Ultra centrifugal filter)를 하여 농축하였다.

[0063] (3) 아민-변형 DNA를 설포-SMCC와 반응하여 아마이드 결합을 형성하였다. 아주린 분자의 시스테인 잔기를 환원시키기 위해 DTT를 처리하여 재조합 아주린을 제조하였다. 상기 재조합 아주린을 아민-변형 DNA-설포 SMCC와 반응하여 티오에스터 본드를 형성하여 재조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체를 제조하였다.

[0064] 보다 상세하게는, 50 μ M 아민-변형 ssDNA(52 mer) 100 μ l을 HEPES 완충액(pH 7.0)에 희석하여 DMF에 희석된 100 μ M 설포-SMCC 200 μ l와 셰이커에서 6시간 동안 반응하였다. 다음, 시스테인-변형 아주린의 티올기-환원을 위해, 재조합 아주린에 20 mM DTT를 실온에서 30분 동안 처리하여 추가적으로 환원시켜 자유 설프히드릴기를 얻었다. 다음, DNA 용액에 100 μ l 에틸아세테이트를 첨가하여 포화된 DTT를 제거하였다. 환원된 티올-환원 재조합 아주린을 탈염 컬럼(PD-10)을 이용하여 혼합용 완충액(20 mM Tris, 50 mM NaCl, 및 1 mM EDTA, pH 7.0)에 옮겼다. 다음, 재조합 아주린-설포 SMCC를 정제하고 한외거르기(MWCO 3k Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, 미국)를 통해 비반응물을 제거하였다. 동일한 물 비의 재조합 아주린을 말레이미도-활성 ssDNA-설포 SMCC와 반응하여 아마이드 결합을 형성하였다. 0 내지 1 M의 연속 염화나트륨 농도구배를 갖는 S excellose 이온-교환 컬럼(Bioworks, 스웨덴)으로 재조합 아주린-SMCC-DNA를 정제하였다. 정제된 단백질을 HEPES 완충액에 투석하였다. 수득한 재조합 아주린-SMCC-DNA를 반복 한외거르기(MWCO 3k Amicon Ultra centrifugal filter)를 하여 농축하였다.

[0065] (4) 아주린 분자의 시스테인 잔기를 환원시키기 위해 DTT를 처리하여 재조합 아주린을 제조하였다. 티올-활성 아주린을 설포-SMCC와 반응시켜 티오에스터 결합을 형성하였다. 아민-변형 DNA를 첨가하여 재조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체를 제조하였다.

[0066] 보다 상세하게는, 재조합 아주린에 20 mM DTT를 실온에서 30분 동안 처리하여 추가적으로 환원시켜 자유 설프히드릴기를 얻었다. 재조합 아주린 용액에 다음, 100 μ l 에틸아세테이트를 첨가하여 포화된 DTT를 제거하였다. 환원된 티올-환원 재조합 아주린을 탈염 컬럼(PD-10)을 이용하여 혼합용 완충액(20 mM Tris, 50 mM NaCl, 및 1 mM EDTA, pH 7.0)에 옮겼다. 제조한 재조합 아주린을 DMF에 희석된 100 μ M 설포-SMCC 200 μ l와 셰이커에서 6시간 동안 반응하였다. 재조합 아주린-설포 SMCC를 정제하고 한외거르기(MWCO 3k Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, 미국)를 통해 비반응물을 제거하였다. 또한, 50 μ M 아민-변형 ssDNA(52 mer) 100 μ l을 재조합 아주린-설포 SMCC에 첨가하여 3시간 동안 셰이커에서 NHS 이스터가 아민과 반응하여 아마이드 결합이 형성되었다. 0 내지 1 M의 연속 염화나트륨 농도구배를 갖는 S excellose 이온-교환 컬럼(Bioworks, 스웨덴)으로 재조합 아주린-SMCC-DNA를 정제하였다. 정제된 단백질을 HEPES 완충액에 투석하였다. 수득한 재조합 아주린-SMCC-DNA를 반복 한외거르기(MWCO 3k Amicon Ultra centrifugal filter)를 하여 농축하였다.

[0067] 결과적으로, 재조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체를 제조하는데 가장 효율이 높은 2번 방법을 채택하였다. cDNA/나노입자 혼성체는 공지된 연구를 따랐다(S.J. Hurst et. al., 2006).

[0068] *재조합 아주린/DNA 혼성체 층의 제조*

[0069] 바이오 프로세싱 장치의 작동 전극을 제조하기 위해, 금(Au) 작동 전극을 Si/SiO₂ 기판 상에 대량으로 제조하였다. 제조된 Au 전극을 피란하(piranha) 용액(30 부피% H₂O₂ 및 70 부피% H₂SO₄)으로 70°C에서 3분 동안 세척하였다. 금 전극을 탈이온수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다.

[0070] 30 μ M 재조합 아주린-SMCC-DNA 용액을 금 기판에 떨어뜨려 재조합 아주린의 시스테인 잔기를 통해 금 표면 상에 직접적으로 자기-조립하였다. 6시간 후에, 금 표면 상에 고정된 재조합 아주린-SMCC DNA 층이 형성되었다. 비반응 재조합 아주린-SMCC-DNA를 제거하기 위해, 탈이온수로 세척하고 질소 가스 하에 건조하였다. 전기 신호를 조절하기 위해, (1) 30 μ M 상보적 ssDNA(cDNA)를 자기-조립된 재조합 아주린/DNA 혼성체 층 상에 6시간 동안 고정화하였다. (2) 또한, 티올-변형 상보적-ssDNA(티올-cDNA)/금 나노입자 및 티올-cDNA2/은(silver) 나노입자 혼성체를 제조하였다.

[0071] 티올-cDNA/나노입자 혼성체를 제조하기 위해, 티올-변형 ssDNA 활성을 위해 자유 설프히드릴기를 생성하고자 30

μM 티올-변형 cDNA를 20 mM DTT로 30분 동안 실온에서 환원시켰다. 100 μl 에틸 아세테이트를 DNA 용액에 첨가하여 포화된 DTT를 제거하였다. 환원된 티올-변형 ssDNA를 탈염 컬럼(PD-10)을 이용하여 10 mM HEPES 완충액으로 옮겼다. 환원된 티올-변형 ssDNA를 300 μl 금 또는 은 콜로이드와 혼합하고 이 혼합물을 6시간동안 실온에서 흔들어주었다. 혼합 용액을 4000 rpm으로 40분 동안 3차례 원심분리를 실시하였다. 침전물을 300 μl HEPES 완충액에 재현탁하여 4°C에 보관하였다.

[0072] cDNA/나노입자 혼성체를 자기-조립된 재조합 아주린/DNA 혼성체 층에 6시간동안 떨어뜨렸다. (3) 중금속이온을 고정화하기 위해, 자기-조립된 재조합 아주린/DNA 혼성체를 황산구리(II)(CuSO_4), 염화코발트(II)(CoCl_2), 황산망간(II) 일수화물($\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$), 산화철(III)(Fe_2O_3), 염화니켈(NiCl_2) 및 황산아연(ZnSO_4)을 포함하는 중금속이온 용액에 6시간 동안 담겼다. 비반응물을 제거하기 위해, 탈이온수로 세척하고 질소 가스 하에 건조하였다.

[0073] 재조합 아주린/DNA 혼성체 층의 형태 분석

[0074] 재조합 아주린/DNA 혼성체를 금 기판 상에 자기-조립하였다. 변형된 표면을 AFM으로 조사하여 재조합 아주린/DNA 혼성체가 금 전극 상에 고정된 것을 확인하였다. 도 2a는 20-30 nm 덩어리로 고정된 티올-변형 ssDNA 층의 지형(topography)을 보여준다. 도 2b는 금 표면에 직접적으로 고정되는 아주린 잔기를 갖는 재조합 아주린 층을 보여준다. 그 결과, 시스테인-변형 아주린은 30-40 nm의 작은 덩어리를 나타내었다. 이러한 결과는 시스테인-변형 단백질이 티올기 및 금 표면 간의 연결로 인해 우수한 방향성으로 자기-조립됨을 보여주었다. 또한, 도 2b는 10-40 nm 범위의 분자 크기를 갖는 자기-조립된 재조합 아주린/DNA 혼성체 층을 확실하게 보여준다. 이러한 지형은 티올-변형 ssDNA, 재조합 아주린 및 재조합 아주린/DNA 혼성체 층에 따라 완전한 차이를 갖는다. 그러므로, 재조합 아주린/DNA 혼성체가 금 기판 상에 잘 배열되어 형성되었다.

[0075] 제조된 재조합 아주린/DNA 혼성체 층의 표면 지형을 AFM(Atomic Force Microscopy, Digital instruments Nanoscope(R)IV, 미국)으로 실온에서 조사하였다. AFM에 230-305 kHz의 공진 주파수를 갖는 1-10 $\Omega\text{-cm}$ 인(n)-도프(Si) 팁(RTESP 팁)을 장착하였다. 모든 결과 이미지의 크기는 500 nm $\times$ 500 nm이고, 스캔율은 1.0 Hz이다.

[0076] 재조합 아주린/DNA 혼성체의 바이오필름 구성 분석

[0077] 재조합 아주린/DNA 혼성체의 표면 특성 및 형태를 확인하기 위해, 라만 분광기(Raman Spectroscopy)를 사용하였다. 도 3e의 왼쪽은 파란색 구리 아주린(600-1750 cm^{-1})의 라만 스펙트라를 보여준다. 200-300 cm^{-1} 의 라만 피크(peak)로 구성된 라만 스펙트라는 Cu^{2+} -S(Cys) 스트레치와 관련이 있고, 약 400 cm^{-1} 의 중심에 있는 라만 피크는 $\text{RS}\rightarrow\text{Cu}^{2+}$ 결합과 관련이 있으며, 800 cm^{-1} 의 라만 피크는 C-S(cys) 스트레치에 관련된다. 이러한 결과는 잘 배열된 것을 의미한다.

[0078] ssDNA의 600-1750 cm^{-1} 라만 스펙트럼은 ssDNA의 다른 요소 및 구조를 반영한 다양한 라만 피크로 구성된다(도 3e, 중간). 뉴클레오티드는 뉴클레오티드(A, G, T 및 C)의 다른 종류의 특징을 갖는 밴드로 확인할 수 있다. 620-680 cm^{-1} 는 구아닌 뉴클레오티드에 상응하고, 727 cm^{-1} 는 아데닌 잔기이며, 티미딘 마커에 가까운 770 cm^{-1} 는 dT의 C2'-엔돌란티 이형태체(C2'-endolanti cofomers)이다. 또한, 800-1100 cm^{-1} 사이의 밴드는 백본의 기하학 및 2차 구조에 민감하였다. “b-형태”는 838 cm^{-1} 피크를 나타내었다. PO2- 피크는 1092 cm^{-1} 에서 나타났다. 또한, 1200-1750 cm^{-1} 부위의 다양한 밴드는 퓨린(purine) 및 피리미딘(pyrimidine) 링 진동을 나타내었다. 1219 cm^{-1} 주변의 피크는 대부분 dT에, 1256 cm^{-1} 주변의 피크는 dC에 기인한다. 가장 유용한 피크는 1489 cm^{-1} 이 나타내는 구아닌이다. 1668 cm^{-1} 근처의 넓은 피크는 dT, dG 및 dC의 결합된 C=O 스트레칭 및 N-H 변형을 의미한다. 관찰된 ssDNA의 라만 피크 및 이의 의미를 표 1에 정리하였다.

표 1

Raman Shift (cm ⁻¹)	Assignment	Raman Shift (cm ⁻¹)	Assignment
630	dC	1160	dG
680	dG	1219	dC, dT
730	Da	1256	dA, dC
781	dT, dC, bk	1331	dA, dG
830	ν OPO	1485	dA, dG
890	D	1573	dA, dG
1019	dT, dG, dC	1668	dT
1092	ν PO ²⁻		

[0079]

[0080]

900 cm⁻¹ 내지 1750 cm⁻¹의 스펙트럼 부위에서 재조합 아주린은 흡수를 나타내지 않는 반면, DNA 스펙트럼은 많은 피크를 보여준다(도 3e, 왼쪽). 이러한 차이는 아주린 및 ssDNA 간의 결합을 확인할 수 있게 해준다. 재조합 아주린 및 ssDNA 사이의 상호작용을 동일한 조건에서 ssDNA의 라만 스펙트럼과 재조합 아주린의 스펙트럼 및 ssDNA의 스펙트럼의 차이점에 기초하여 조사하였다. 도 3e의 오른쪽은 ssDNA 및 재조합 아주린 상호작용에 의한 피크로 구성된 재조합 아주린/DNA 혼성체의 라만 스펙트럼을 보여준다. (1) 200 cm⁻¹ 내지 600 cm⁻¹의 라만 피크는 재조합 아주린의 존재와 관련이 있고, 200-300 cm⁻¹는 Cu₂-S(cys) 스트레치, 400 cm⁻¹는 RS-→Cu₂와 관련이 있다. (2) C-S(cys) 스트레치(800 cm⁻¹)와 관련이 있는 재조합 아주린의 라만 피크는 DNA(dT, dC, bk)의 781 cm⁻¹ 라만 피크와 겹쳐진다. (3) DNA 라만 스펙트럼의 1485 cm⁻¹ 피크는 δ C8H 및 N9C8-C8-N7 구아닌 진동과 관련이 있다. 재조합 아주린 및 ssDNA 사이의 상호작용으로 인해 이러한 피크는 업시프트(1490 cm⁻¹)에서 발견된다(도 3e, 오른쪽). 그러므로, G-C 쌍 부분에서의 DNA와 재조합 아주린의 상호작용은 구아닌의 N7 부위 또는 구아닌의 이미다졸 모이어티(moiety)의 바깥부분에서 일어난다. (4) 또한, 이러한 상호작용은 아데닌 C5C4-C4-N3 내부 진동 및 구아닌 C4N3-C5C4-N7C5 내부 진동과 관련된 1573 cm⁻¹에서 피크의 업시프트 및 강도를 증가시킨다. 피크의 강도 및 위치 변화는 주로 재조합 아주린과 구아닌의 N7 위치와의 상호작용에 기인한다. 그러므로, 재조합 아주린은 아데닌 및 구아닌의 N7 위치와 상호작용하고 이러한 상호작용은 아데닌 및 티민 염기 사이의 수소 결합의 변형을 야기한다. (5) 반면, 티민기의 C5C4 및 C4O 진동과 관련된 1668 cm⁻¹에서의 피크 강도는 ssDNA 및 재조합 아주린의 상호작용에 의해 감소한다. 이러한 감소는 C=O 스트레칭 및 N-H 변형 모드의 낮은 빈도로 이동하기 때문이다. 그러므로, 재조합 아주린의 상기 위치에서의 상호작용은 아데닌의 NH₂기 및 티민의 C4O기의 변형을 통해 DNA 구조를 변화시켰다. (6) 또한, 1219 내지 1257 cm⁻¹에서의 라만 피크의 강도는 dT 및 dC의 N-H 부위에서 재조합 아주린 또는 ssDNA 사이의 상호작용을 의미한다. 모든 피크 값은 표 1에 정리하였다. 결론적으로, 제조된 금 표면에 고정된 재조합 아주린/DNA 혼성체 층은 바이오메모리 모듈로 이용될 수 있다.

[0081]

역광학현미경(Olympus IX71, 일본)이 장착된 Scanning Confocal Raman Spectrometer(NTMDT, 러시아)를 사용하여 라만 스펙트럼을 모니터링 하였다. 785 nm 파장에서 빛을 발산하는 근적외선 레이저로부터 라만 스펙트럼을 구하였다. 스캔율은 200-1750 cm⁻¹이고, 평균 강도를 라만 신호로 사용하였다. 스캐닝 범위를 최대 100 μ m $\times$ 100 μ m $\times$ 6 μ m(X, Y, Z 축)로, 스캐닝 시간은 10초이다. XY 평면의 최대 해상도는 200 nm 및 500 nm이다.

[0082]

전기화학적 특징 I

[0083]

본 발명은 혼성체의 각 부분이 고유한 역할을 갖도록 디자인하였다. 시스테인-잔기를 통해 금 기관 상에 고정된 재조합 아주린은 플랫폼 모듈로 기능한다. 다른 두 기능을 갖는 링커 설폰-SMCC를 재조합 아주린과 티올-변형 DNA 분자를 연결하는데 사용하였다. 신호 오퍼레이터 물질이 투입되었을 때, 티올-변형 ssDNA는 신호 수용체 모듈로 기능한다. 재조합 아주린, ssDNA 및 재조합 아주린/DNA 혼성체의 산화환원능을 비교하기 위해, CV를 측정하였다. 각 시료는 5차례 각각 반복하였다(도 4). 재조합 아주린의 경우, 산화환원능이 관찰되었

고, 159 ± 23 mV 환원 전위 및 272 ± 22 mV 환원 전위를 각각 확인하였다. 티올-변형 ssDNA의 환원 전위 및 산화 전위는 각각 93 ± 19 mV 및 292 ± 26 mV로 측정되었다. 재조합 아주린/DNA 혼성체의 경우에 187 ± 31 mV 환원 전위 및 301 ± 14 mV 산화전위를 각각 확인하였다. 환원 전위 값은 재조합 아주린의 환원 전위 값과 유사하고, 산화 전위 값은 ssDNA와 유사하다. 산화환원능은 재조합 아주린에서 비롯되었을 것이다. 양 피크는 가시적이고 정상 아주린과 일치한다. 재조합 아주린, ssDNA 및 재조합 아주린/DNA 혼성체의 환원 전류는 각각 1.783 ± 0.281 μ A, 1.264 ± 0.377 μ A 및 1.888 ± 0.394 μ A이다. 또한, 재조합 아주린, ssDNA 및 재조합 아주린/DNA 혼성체에 대한 산화 전류는 각각 -2.124 ± 0.455 μ A, -1.761 ± 0.263 μ A 및 -1.645 ± 0.123 μ A이다. 이는 표 2에 정리하였다. 이러한 결과는 재조합 아주린/DNA 혼성체의 산화환원능이 결합에 의해 변하는 것을 명백하게 나타낸다. 생체분자 및 전자 이동의 자연적인 특징은 변할 수 있다. 이러한 결과에 기초하여, 금 작동 전극 상에 자기-조립된 재조합 아주린/DNA 혼성체는 적절한 전기화학적 특징을 나타냄을 확인하였다.

[0084]

정보 조절의 기본 기작

[0085]

본 발명의 바이오메모리 조절용 장치는 전기화학적 방법을 사용하여 작동한다. 신호 조절의 기본적인 원칙은 생체분자-입력 분자 인터페이스에서의 전자 전달 및 공여체-브리지-수용체(donor-bridge-acceptor) 시스템의 에너지 정도 변화로 설명된다. 재조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체의 경우에, 브리지는 DNA-금속 이온 인터페이스에서 전자전달을 가능하게 한다. 또한, 다른 종류의 전자 전달은 ,환경 조건(구조, 유래, 이온의 크기), 확산율 및 투입율과 같은 몇 가지 요소에 의해 영향을 받는다. 입력물질은 공여체 및 수용체 사이의 에너지 정도를 극복하는 공여체와 수용체 시스템 사이의 브리지를 제공받는다. 다음의 반응으로 신호 조절의 기본적인 기작을 설명한다:

[0086]

Au/재조합 아주린/SMCC/DNA/ HEPES-H^+ /Pt (1)

[0087]

Au/재조합 아주린/SMCC/DNA/cDNA/중금속 이온/ HEPES-H^+ /Pt (2)

[0088]

Au/재조합 아주린/SMCC/DNA/cDNA/나노 입자/ HEPES-H^+ /Pt (3)

[0089]

반응 (1)과 비교하여 반응 (2) 및 반응 (3)은 브리지가 존재한다. 이는 금속 이온 및 나노입자와 같은 다양한 입력 물질이 에너지 정도를 조절하는 것이다. 이러한 현상은 전기화학적 신호 조절할 수 있다.

[0090]

전기화학적 특징 II

[0091]

재조합 아주린/DNA 혼성체에 다양한 중금속 이온을 투입하는 경우에, 산화환원능의 CV 결과를 도 5에 나타내었다. Mn 이온을 투입하는 경우, 환원 전위 및 산화전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 413 ± 71 mV 및 305 ± 47 mV로 변화하였다. 또한, 환원 전류 및 산화 전류는 0.114 ± 0.039 μ A 및 -0.088 ± 0.012 μ A에서 1.495 ± 0.552 μ A 및 -2.804 ± 0.604 μ A로 변화하였다. Fe 이온을 투입하는 경우, 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 349 ± 52 mV 및 374 ± 55 mV로 변화하였다. 환원 전류 및 산화 전류는 0.114 ± 0.039 μ A 및 -0.088 ± 0.012 μ A에서 1.361 ± 0.192 μ A 및 -1.958 ± 0.249 μ A로 변화하였다. Co 이온을 투입하는 경우, 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 320 ± 59 mV 및 350 ± 34 mV로 변화하였다. 환원 전류 및 산화 전류는 0.114 ± 0.039 μ A 및 -0.088 ± 0.012 μ A에서 1.338 ± 0.262 μ A 및 -1.493 ± 0.356 μ A로 변화하였다. Zn 이온을 투입하는 경우, 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 246 ± 41 mV 및 334 ± 52 mV로, 환원 전류 및 산화 전류는 0.114 ± 0.039 μ A 및 -0.088 ± 0.012 μ A에서 1.288 ± 0.392 μ A 및 -1.499 ± 0.410 μ A로 변화하였다. Ni (II) 이온을 투입하는 경우, 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 166 ± 31 mV 및 487 ± 71 mV로, 환원 전류 및 산화 전류는 0.114 ± 0.039 μ A 및 -0.088 ± 0.012 μ A에서 1.508 ± 0.477 μ A 및 -7.620 ± 0.842 μ A로 변화하였다. 도 2d는 이러한 조절 영향을 보여준다. Cu(II) 이온을 투입하는 경우, 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 106 ± 27 mV 및 275 ± 34 mV로, 환원 전류 및 산화 전류는 0.114 ± 0.039 μ A 및 -0.088 ± 0.012 μ A에서 2.384 ± 0.415 μ A 및 -2.287 ± 0.356 μ A로 변화하였다. 이러한 결과는 용이한 방법으로 다양한 입력 물질에 대한 전기화학적 정보의 조절이 가능함을 의미한다.

[0092]

정보 강화 및 조절

[0093] 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 정보 조절을 위해 종래의 3 전극 시스템에 의해 작동된다. 모든 전기 화학적 측정은 페러데이 케이지(Faraday cage) 내에서 수행되었다. 제조합 아주린/DNA 혼성체가 고정된 Au 기판을 작동 전극으로 사용하였다. Pt 상대 전극 및 Ag/AgCl 기준 전극을 순환 전압전류법(CV) 및 대시간전압법(CA)을 포함하는 전기화학적 실험에 사용하였다. 전기화학적 실험은 CHI660A 전기화학적 워크스테이션(CH Instruments, 미국)에서 실시하였다. 모든 결과는 대기 조건하에 수집하였다. 각 측정 동안, N₂ 가스 블랭킷 하에 용액을 보관하였다. 각 볼타모그램(voltammogram)은 50 mVs⁻¹의 스캔율로 음전위 한계치로부터 양전위 한계치까지 스캔하였다.

[0094] 정보 증폭

[0095] 주사 터널링 분광법(Scanning Tunneling Spectroscopy; STS) 측정은 Digital instruments Nanoscope(R) IV(미국)로 상온에서 500 pA의 세트 포인트 및 100 mA 편향으로 수행되었다. 터널 전류를 ±2.0 V 범위의 편향 램핑(ramping)으로 모니터링하였다. 나노스케일에서의 전기적 특성을 위해, 접촉 중간에 제조합 Azu/DNA 혼성체 및 제조합 Azu/DNA-cDNA/나노입자 혼성체에 대하여 금 기판을 하부 전극으로 이용하고, 14 nm 전도성 STM 팁을 상부 전극으로 이용하였다. STS는 피드백제어를 불능화한 후 분리된 제조합 Azu/DNA 혼성체 및 제조합 Azu/DNA-cDNA/나노입자 혼성체에 텅스텐(W) 팁을 위치하여 실시하였다.

[0096] 실험결과

[0097] 분자 전자 장치의 한계를 극복한 바이오프로세싱 장치를 개발하기 위해, 단순 금속단백질을 갖는 바이오 메모리 장치로부터 단일 혼성체 분자를 갖으며 다양한 기능을 수행이 가능한 새로운 바이오 프로세싱 장치를 최초로 고안하였다. 고안된 바이오 프로세싱 장치는 현재의 실리콘-기반 전자 장치와 비교하여 ‘다목적 기능’의 차이점을 갖는다. 대개, 유기-분자 기반의 전자 장치는 ‘스위칭(switching)’, ‘온/오프’ 또는 ‘인/아웃’과 같은 단순한 기능을 작동하며 이러한 작동은 다양한 구성 요소의 집적화를 요구한다. 그러나, 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 특히, “작용-반작용” 시스템과 같은 인간 뇌의 유기성과 유사한 생체 촉매 작용을 위해 효소 시스템이 결합된 조절 기능(생화학적 입력)을 모방한다. 생화학적 반응은 기계 언어로 설명될 수 있는 단일 분자 수준에서 물질 특성의 변화 또는 구조적 재편성으로서 관찰되므로, 종래의 화학 물질 변화 대신 컴퓨팅 작동으로 화학적 과정을 나타낼 수 있다. 이러한 개념은 바이오 혼성 분자-기반의 바이오컴퓨팅 시스템의 개념으로 확대할 수 있다.

[0098] 따라서, 본 발명자들은 ‘정보 강화’, ‘정보 조절’ 및 ‘정보 증폭’과 같은 3 종류의 기능을 수행할 수 있는 단일 혼성 분자를 기반으로 한 바이오 프로세싱 장치를 개발하였다. 이러한 독립적인 기능들은 금속단백질의 산화환원 특성과 입력된 물질 간의 상호작용에 의해 유래된다. 바이오전자 장치 내 단일 바이오 혼성 물질의 상기 3 기능을 수행하기 위해, 발명자들은 화학적 연결 방법(chemical ligation method; CLM)을 이용한 제조합 아주린/DNA(Azu/DNA) 혼성 분자를 고안하였다. 도 3a는 메모리 조절 기작의 기본적인 개념을 보여준다. 이러한 기작은 금속단백질의 산화환원 특성 및 입력된 물질 간의 상호작용을 보여주고 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 제조합 아주린은 조절 오퍼레이터의 역할을 갖는 DNA의 메모리 플랫폼으로 이용된다. 입력된 중금속이온 또는 cDNA-전도성 나노입자는 혼성 분자에 결합될 수 있다. 이러한 조절 입력 반응을 CV(Cyclic voltammetry)로 측정하였고, 이의 적용을 CA(chronoamperometry)로 조사하였다. 최종적으로, 조절 입력으로서 DNA-반도성(semi-conducting) 나노입자의 경우에, STS를 이용하여 정보 증폭기능을 확인하였다.

[0099] 바이오프로세싱 장치

[0100] 고안된 바이오프로세싱 장치는 지정된 위치에 투입된 물질에 상응하는 다양한 기능을 용이하게 평가 및 조절할 수 있다. 이에 위해, 제조된 Azu/DNA 혼성체는 자기-조립 방법(Self-assembly method)에 의해 금(Au) 표면에 흡착하였다. Azu/DNA 혼성체는 CLM에 의해 결합된다. Azu/DNA 혼성체의 결합 방법은 도 1에 개시되어 있다. SDS-PAGE 분석을 위해, 제조합 아주린-SMCC-DNA 복합체의 예상 크기에 상응하는 제조합 아주린-SMCC-DNA 복합체(Azu/DNA 혼성체) 밴드를 겔 상에서 확인하였다(도 3c, 왼쪽). 제조합 아주린의 경우에 분자량은 약 14.4 kDa이고 ssDNA는 약 16.1 kDa이며, 제조합 아주린-SMCC-DNA 복합체는 약 30.5 kDa이다. 고순도의 제조합 Azu/DNA 복합체가 형성된 것을 확인하였다. 또한, 제조합 아주린-SMCC-DNA 복합체를 분석하기 위해 UV-

Vis 분광기 측정을 실시하였다. UV-Vis 분광기로 260 nm에서 재조합 아주린-SMCC-DNA 복합체 농도를 측정하였다(복합체의 흡광계수는 $260,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이다). *Pseudomonas aeruginosa* 유래 아주린은 파란색 구리 금속단백질이다. 파란색 구리 금속단백질은 5개 잔기(Gly45, His46, Cys112, His117 및 Met121)를 갖고, 627 nm에서 흡수가 일어나는 독특한 기하학적 구조를 형성한다. 반면, 티올-변형 ssDNA는 627 nm에서 강하게 흡수하지 않는다. 재조합 아주린-SMCC-DNA 복합체와 달리, 재조합 아주린은 그의 기하학적 구조 및 627 nm에서의 흡수하는 성질을 유지한다. 도 3c(오른쪽)는 재조합 아주린의 UV 스펙트라를 보여준다. 따라서, 생물복합체를 평가하는데 UV-Vis 스펙트라를 이용할 수 있다. 이러한 분석에 근거하여, 재조합 아주린-SMCC-DNA 혼성체는 독특한 구조를 생성/유지하는 것을 보여주었다. 도 3d는 Azu/DNA 혼성체의 AFM 이미지를 보여주고, 도 3e는 Azu/DNA 혼성체 자기-조립층의 라만(Raman) 분석 결과를 보여준다.

[0101] 순환 전압전류법

[0102] 정보 강화의 개념은 전기화학-기반 2-상 바이오메모리로부터 유래하였다. 기본적으로, 2-상 바이오메모리는 순환 전압전류법으로 구한 산화 전위 및 환원 전위의 2 가지 입력 변수에 의해 작동된다. 따라서, 이러한 값을 이해하기 위해 CV 측정을 수행하였다. 도 6a는 1) Azu/DNA 혼성체 및 2) Azu/DNA-cDNA/GNP 혼성체의 CV 결과를 보여준다. Azu/DNA 혼성체의 환원 전위 및 산화 전위는 각각 $67 \pm 31 \text{ mV}$ 및 $84 \pm 14 \text{ mV}$ 이다. 결과는 cDNA-GNP가 Azu/DNA 분자에 추가되는 경우에 산화/환원 반응 신호가 증대되는 것을 나타낸다. 산화 전위 및 환원 전위의 값은 $232 \pm 39 \text{ mV}$ alc $83 \pm 68 \text{ mV}$ 이다. 또한, 3가지 생체분자(재조합 아주린, 티올-변형 ssDNA 및 Azu/DNA 혼성체)의 산화-환원적 특성을 대조군으로 하여 조사하였다. 결과는 도 4 및 표 2에 나타내었다.

표 2

Potential	Reduction Potential (mV)	Oxidation Potential (mV)
Recombinant Azurin	159 ± 23	242 ± 22
ssDNA	93 ± 19	292 ± 26
Azurin-DNA	67 ± 31	84 ± 14

Current	Reduction Current (10^{-7} A)	Oxidation Current (10^{-7} A)
Recombinant Azurin	1.783 ± 0.281	-2.124 ± 0.455
ssDNA	1.264 ± 0.377	-1.761 ± 0.263
Azurin-DNA	1.140 ± 0.394	-0.877 ± 0.123

[0103] 정보 강화 수행능력을 평가하기 위해, 정보 저장 능력을 증명하기 위한 대시간전압법(CA)을 실시하였다. 대시간전압법은 측정된 산화 전위 및 환원 전위를 제조된 작동전극에 적용할 수 있게 하였다. 그 결과, 양 산화 및 환원전위에 대한 유도 전류 전위에서 전하 저장 기능에 대하여 On/Off 교환할 수 있는 장치임을 의미한다.

[0104] 이러한 접근법을 통해, 산화 전위 및 환원 전위를 이전 CV 실험에서 얻은 작동 전극에 적용할 수 있다. 산화 전위를 적용하는 경우에, 전위는 전자를 Azu/DNA 혼성체로부터 전극으로 이끌어 양성 전하가 저장되게 한다. 이러한 상태를 ‘쓰기’ 상태로 간주한다. 환원 전위의 적용은 전자전송의 Azu/DNA 혼성체로의 유출을 생성할 수 있으며, 이러한 상태를 ‘지우기’ 상태로 간주한다. 산화전위 및 환원전위의 적용 및 전류 반응의 측정은 전기화학적 시스템의 저항-용량(resistance-capacitance; RC) 시간 상수에 의존적이다. 도 6b에서 볼 수 있듯이, 232 mV 산화전위 인가는 정량적으로 Azu/DNA 혼성체 층을 산화시켜(쓰기 상태) 결과적으로 혼성체에 양전하가 저장되고, 83 mV 환원전위 인가는 상기 혼성체 층을 원래 상태로 전환시킨다(지우기 상태). 환원전류는 산화전류와 동일한 규모를 갖는다. 도 6c는 232 mV의 산화전위 단계 및 83 mV의 환원 전위 단계의 전류 반응의 2가지 타입이 Azu/DNA 혼성체 층에 적용되어 종래의 바이오메모리 기능을 확인한 결과를 보여준다(도 6c; 검정

라인). 정보 강화의 기능은 종래의 바이오 메모리 기능과 유사하다. 그러나, cDNA-GNP를 Azu/DNA 혼성체에 추가하는 경우에 전하 저장 능력은 종래의 바이오메모리와 비교하여 한정된 영역에서 극적으로 증대된다(도 6c; 보라 라인). 이러한 특징을 단일 생물혼성 분자의 '정보 강화(information reinforcement)'이라고 정의하였다.

이러한 전류값은 다음의 수식식(1)로 Azu/DNA 혼성체가 갖는 전하 저장값을 용이하게 추산할 수 있다:

[수식식]

$$Q = \int i dt$$

(1)

쓰기 또는 지우기 단계에 의해 Azu/DNA 혼성체에 저장된 전하의 양은 CA의 전류로부터 계산하면 5.328×10^{-7} C이다. 유사하게, Azu/DNA-cDNA/GNP에 저장된 전하는 4.636×10^{-6} C이다. 결과는 Azu/DNA-cDNA/GNP의 전하 능력이 Azu/DNA 혼성체와 비교하여 대략 870% 증가한 것을 말해준다. 아마도, 이러한 결과는 생체분자를 나노입자와 결합하여 생체나노 혼성체를 제조하였을 때, 에너지 레벨이 섞일 수 있는 확률이 생기고, 이로 인해 큰 에너지 전달 효과가 생긴다. 몇몇 그룹에서 이전에 생체물질에 나노입자가 결합되었을때, 에너지 정도 혼합 및 이의 전자 전송의 영향을 보고하였다. 그러므로, 이러한 현상은 생체분자-전도성 나노입자 인터페이스를 통한 전자 전달 대한 공여체-브리지-수용체 시스템에 기인한다. 이러한 기작과 함께, 정보 저장 기능은 구축될 수 있고 이러한 기능을 6주기(12단계) 동안 연속적으로 조사하였다. 도 6d 및 도 6e는 산화 전위, 환원 전위 및 이의 전류 응답에 대한 도식을 보여준다. 본 명세서에서, 산화 전위 및 환원전위의 인가로부터 '1' 및 '0'의 정보값으로의 더 하전된 전류로 간주할 수 있다. 또한, 도 6f는 300 주기동안 유지되는 정보 수행 능력을 보여준다. 이러한 결과는 본 발명의 정보 저장 기능의 안정성 및 반복성을 보여준다. 본 발명은 Azu/DNA-cDNA/GNP 혼성체의 정보 강화를 용이하게 조절할 수 있음을 보여준다. 이러한 현상은 바이오프로세싱 장치에서 전도성 나노입자가 정보 강화에 대한 강력한 물질임을 의미한다. 결과적으로, 최초의 바이오프로세싱 기능을 구축하였다.

정보 조절

정보 조절 기작을 증명하기 위해, 다양한 입력 물질을 추가하여 Azu/DNA 혼성체와 반응하여 출력 정보를 구하였다. 구한 값에 따르면, 금속 이온에 상응하는 정보를 조절할 수 있다. 정보 조절을 실시하기 위해, ssDNA를 조절 오퍼레이터로 사용하였다. Azu/DNA의 ssDNA 암은 상보적인 ssDNA(cDNA) 분자에 대하여 높은 선택결합능을 갖기 때문이다. 본 발명에서 cDNA는 다양한 적용을 위한 강력한 도구이다. ssDNA 암(arm)은 Cu, Zn, Ni, Co, Fe 및 Mn과 같은 다양한 중금속 이온에 결합할 수 있는 대전된 백본(backbone)을 갖는다(도 7a). 그러므로, ssDNA 암은 조절 수용체로 사용할 수 있고, 중금속이온과 같은 입력 물질을 조절 오퍼레이터로 간주할 수 있다. DNA 분자는 금속 이온에 결합할 수 있는 4가지 잠재적 부위를 구성함을 보여주었다. 1) 음전하 전인 산염 산소 원자; 2) 리보오스 히드록실기; 3) 염기링; 및 4) 고리밖(exocyclic) 염기 케톤기. 전하 전송동안 DNA와 중금속 이온의 상호작용은 전기화학적 신호를 조절하고 전송하는데 필수적인 역할을 한다. 또한, dsDNA에 대한 Cu(II) 및 Ni(II)의 영향은 이전에 연구되었다. 추가적으로, 생체분자의 전기화학적 특성은 아주된 분자의 중심에 위치하는 Ni(II), Co(II) 및 Mn(II)과 같은 치환된 금속이온의 존재에 따라 다양하다. 본 발명에서는 중금속 이온과 같은 다른 입력 물질이 Azu/DNA 혼성체의 전기화학적 특성에 큰 영향을 미칠 것이라 생각하였다.

Mn 이온의 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 413 ± 71 mV 및 305 ± 47 mV로 변하였고, Fe 이온의 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 349 ± 52 mV 및 374 ± 55 mV로 변하였으며, Co 이온의 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 320 ± 59 mV 및 350 ± 34 mV로 변하였다. Zn 이온의 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 246 ± 41 mV 및 334 ± 52 mV로 변하였고, Ni(II) 이온의 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 140 ± 22 mV 및 437 ± 71 mV로 변하였다. Cu(II) 이온의 환원 전위 및 산화 전위는 67 ± 31 mV 및 84 ± 14 mV에서 106 ± 27 mV 및 275 ± 34 mV로 변하였다. 산화/환원 전위의 값을 도 7b에 나타내었다. 수득한 산화 전위 및 환원 전위를 메모리 조절 변수로 사용하였다. 또한, 각 경우의 순환 전압전류법 결과를 도 5에 나타내었다. 도 7c는 중금속 이온과 같은 다양한 입력 물질을 추가한 경우의 Azu/DNA 혼성체의 전위 변동값을 보여준다. 도 7c는 다양한 입력 물질을 각각 추가한 경우의 환원

전위 조절을 설명한다. 또한, 다양한 입력 물질을 각각 추가한 경우의 Azu/DNA 혼성체의 산화 전위 값과 비교한 산화 전위 조절을 보여준다.

[0112]

이러한 조절 변수로 대시간전압법에 의한 정보조절을 조절할 수 있다. 도 7d는 중금속 이온의 입력에 따른 조절된 바이오프로세싱 장치를 나타낸다. Azu/DNA-Mn 혼성체에 413 mV 산화 전위 및 305 mV 환원 전위를 5초 동안 반복적으로 인가하는 경우, 전자가 저장 및 삭제됨을 관찰하였다. 도 7d의 노란색 라인은 이의 전류 반응을 보여준다. 특히, 산화 전위의 인가는 $0.37 \pm 0.12 \mu\text{C}$ 전자를 한번에 저장할 수 있었다. 또한, Azu/DNA-Fe 혼성체 층에 374 mV 산화 전위를 인가하는 경우에 전자 $0.51 \pm 0.13 \mu\text{C}$ 이 한번에 저장되었다. 349 mV 환원 전위의 인가는 그 정보를 삭제하였다. 이러한 메모리 조절 단계를 6차례 반복하였다(도 7d). 또한, 350 mV 산화 전위 및 320 mV 환원 전위를 Azu/DNA-Co 혼성체에 인가하는 경우에 전자 $0.56 \pm 0.28 \mu\text{C}$ 이 5초 동안 충전 및 방전됨을 확인하였다. 유사하게, Azu/DNA-Zn 혼성체 층에 334 mV 산화 전위 및 246 mV 환원 전위를 각각 인가하여 메모리 조절 기능을 조사하였다. $1.59 \pm 0.41 \mu\text{C}$ 전자가 조절되었고, 이러한 전하 스위칭을 7차례 반복하였다. Azu/DNA-Ni 혼성체 층에 437 mV 산화 전위 및 140 mV 환원 전위를 각각 인가한 경우(도 7d, 녹색 라인) 및 Azu/DNA-Cu 혼성체 층에 275 mV 산화 전위 및 106 mV 환원 전위를 각각 인가한 경우(도 7d)에 각각 $4.10 \pm 0.59 \mu\text{C}$ 및 $1.33 \pm 0.34 \mu\text{C}$ 의 조절된 전류(modified current)를 나타내었다. 따라서, 전기화학적 정보 조절은 바이오-전기화학적 변환기, 중금속 이온 검출 바이오센서, 생물-기반 배터리 장치 및 단백질/DNA 혼성체 및 금속 이온 사이의 작용을 이해하기 위한 플랫폼과 같은 다양한 적용성을 갖는다. 단순히, 본 발명의 단백질/DNA 혼성체로 구성된 바이오프로세싱 시스템은 용이한 방법을 통해 다양한 중금속 이온에 의한 메모리 조절 기능을 보여준다.

[0113]

정보 증폭

[0114]

정보 증폭 기능을 증명하기 위해, 금(Au) 표면에 고정된 Azu/DNA 혼성체 및 Azu/DNA-cDNA/QD(스트렙타비딘-코팅된 CdSe-ZnS와 결합된 Azu/DNA 혼성체/바이오틴-태깅 cDNA)를 STS 측정하였다. STM은 높은 공간 해상도를 갖는 측정법으로, Azu/DNA 혼성체 분자 및 Azu/DNA-cDNA/QD 혼성체의 몇몇 포인트에서 $I-V$ 데이터를 취득하였다. 결과는 Azu/DNA 혼성체의 $I-V$ 곡선에 미차가 있음을 보여준다. 이는 전자터널이 전체 분자에서 발생함을 의미한다. 도 8a는 이중-장벽 터널-접합(Double-Barrier Tunnel-Junction;) 배치 형태에서 Azu/DNA 혼성체를 통한 정보 증폭에 유용한 도구인 STS의 구성을 보여준다. 도 8a는 Azu/DNA 혼성체의 전체에 걸쳐 STM 팁에 의해 포지셔닝되는 DBTJ를 나타낸다. 접합 지점을 가로지르는 터널링 컨덕턴스(tunneling conductance)를 다양한 전위로 측정할 수 있다. 또한, Azu/DNA 혼성체 접합 지점의 정전 용량(capacitance, C_1) 및 터널링 저항(tunneling resistance, R_1)은 STM 편향(V_s) 및 전류 세팅(I_s)의 조절에 의해 조절할 수 있는 팁 혼성체 거리를 변화시켜 용이하게 조작할 수 있다. 반면에, Azu/DNA 혼성체 접합 변수(C_2 및 R_2)는 거의 일정하다. C_1 값을 달리함으로써, 정전 용량 값, 정전 용량 비($V_1/V_2 = C_2/C_1$)에 의해 결정되는 양 접합지점 간의 전압 분포에 의존적으로 단일 전자 충전 에너지(EC)를 변경할 수 있다. 도 8b는 Azu/DNA 혼성체에 -0.5 내지 +0.5 V의 편향 전압을 인가하여 비저항 거동 및 다이오드와 같이 반응함을 보여준다. 그러나, 도 8c는 전기적 쌍안정(electrical bistability)을 나타내는 -2.0 내지 +2.0 V 인가 하에 Azu/DNA-cDNA/QD 혼성체의 $I-V$ 특성을 보여준다. 전압 스캔의 범위는 스캐닝이 고전도 상태를 유지할 수 없을 정도로 좁게 유지하였다. 관측된 바에 의하면, Azu/DNA-cDNA/QD 혼성체는 초기에 Off 상태라는 낮은 전도성 상태가 0.8 V까지 유지되다가 On 상태라는 갑자기 급격한 전류가 흐르는 상태로 변하게 되는데, 이는 컨쥬게이트의 이동에 의한 Off 상태에서 On 상태의 이동이며, 이는 메모리 장치의 저장 상태와 같다. 음전압이 인가되는 경우에, 바이어스 전압이 장치의 삭제 상태의 약 -0.8 V와 같게 되어 혼성체는 낮은 전도 상태(OFF 상태)로 돌아간다. 이러한 낮은 전도율에서 높은 전도율로의 전이 변화는 CdSe-ZnS 코어-셸 나노입자의 낮은 에너지 코어로의 터널링을 통한 Cu(I) 및 Cu(II) 밀도로 전자를 이동시키는 전하공여체 아주린 때문이다. 자유 전자가 두 금속 전극 사이에 긴 많은 에너지 정도를 분배하는 이중-터널 접합을 형성하여 혼성체에 터널을 만든다. 바이어스 전압이 충분히 높게 주어졌을 때, 자유전자는 장벽을 관통하여 터널을 만들어 Au 및 Pt 전극에 대한 극성을 만든다. 결과적으로, 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 정보 증폭에 대한 전도도의 극적인 변화를 갖는다. 인가된 바이어스 전압이 제거된 경우에, 양극화된 전하는 재결합할 수 없어, 장치는 역방향 바이어스 전압으로만 회복할 수 있는 고전도 상태로 남는다.

[0115]

또한, 0-2-0 V(Scanning Tunneling Spectroscopy 라는 장치 측정법으로 인가하게 되는 전압) 인가 하의 두 스윙전압 방향을 갖는 STM의 Pt/Ir(백금/이리듐) 팁으로 측정한 Azu/DNA-cDNA/QD 혼성체 코어-셸 나노입자의 단층

의 I-V 특징을 도 8d에서 보여준다. 이는 장치가 약 2 V의 투입 전류에서 증가로 높은 상태(ON 상태)로 전환되어 낮은 전도 상태(OFF 상태)에서 높은 전도 상태(ON 상태)로 전이되는 것을 보여준다. OFF 상태에서 ON 상태로의 전이는 디지털 메모리 셀에서의 “쓰기” 과정에 상응하고, 이러한 전이는 “정보 증폭”으로 정의할 수 있다. Azu/DNA-cDNA/QD의 가장 중요한 특징 중 하나는, OFF 상태가 역전압 펄스의 인가로 회복될 수 있는 것이다. 이는 디지털 메모리 셀의 “삭제” 과정에 상응한다. 도 8d는 장치의 역방향 바이어스 인가 후, I-V 특징을 보여준다. 장치는 1.1 V에서 높은 전도 상태에서 낮은 전도상태로 전환되었다. 이러한 OFF-ON 전이의 쌍안정 반응 및 비휘발성 정보 증폭효과의 창출은 금속 전극 사이의 혼성체 분자의 존재에서만 관찰 될 수 있다. 운반 억제제 물질로 작용하는 혼성체는 Au 전극의 작동 기능 및 혼성체 층의 HOMO(Highest Occupied Molecular Orbital) 레벨 간의 상대적으로 많은 에너지 장벽으로 인해 전자를 막는다. 파울러 노드하임(Fowler-Nordheim) 터널링 과정을 통해 Pt/Ir 팁으로부터 LUMO 상태로 전자가 투입된 후 양성 인가 전압이 전극에 인가되는 경우, LUMO(Lowest Occupied Molecular Orbital) 레벨에 존재하는 전자는 터널링 과정을 통해 인가된 바이어스 전압의 방향을 따라 혼성체 분자 사이로 전달된다. 이것은 쓰기 단계를 의미한다. 음성 전기장 하에 Azu/DNA-cDNA/QD의 원자가(valence) 밴드 안에 포획된 전자로 인해 음성 인가 전압이 전극에 인가되는 경우, 파울러 노드하임(Fowler-Nordheim) 터널링 과정을 통해 Pt/Ir 전극으로 전달된다. 이는 지우기 단계를 의미한다. 디지털 메모리 셀의 지우기 과정과 동일하다. 본 발명의 Azu/DNA-cDNA/QD는 정보 증폭 기능을 수행하였다.

결론

본 발명에서, 정보를 강화, 조절 및 증폭할 수 있는 단백질/DNA/나노입자 혼성체로 구성된 신규한 바이오 프로세싱 장치를 최초로 보여주었다. 본 발명의 장치는 분자-스케일의 바이오컴퓨팅에 대한 총체적 개념을 넘어선다. 첫째로, 본 발명의 바이오 프로세싱 장치는 정보 강화 기능을 수행할 수 있다. 이러한 기능은 종래의 바이오 메모리 장치와 비교하여 더 많은 전자를 저장할 수 있다. 둘째, 정보 조절은 입력 물질에 의존적으로 다양한 전위를 평가할 수 있다. 이러한 조절 기능은 멀티-비트 바이오 메모리와 같은 적용 가능성을 제공할 수 있다. 셋째, 고상-상태 바이오트랜지스터로 정보 증폭을 적용할 수 있다. 이러한 결과는 단일 혼성체 분자를 이용한 정보 조절에 기반으로한 본 발명의 접근이 단일 분자에서 다-기능을 수행할 수 있는 바이오 프로세서 개념을 포함함을 의미한다. 단순 기능적 특성 및 본질적인 문제로 생체분자를 일반화하는 것은 어렵다. 그러나, 본 발명의 장치는 단일 혼성체 분자가 다기능을 수행할 수 있음을 보여준다. 본 발명은 단일 혼성체 생체분자에서 바이오컴퓨팅 시스템과 같은 목표의 기틀이 될 것이다.

참고문헌

- [1] Y. Cui, C. M. Lieber, *Science* 2001, 291, 851.
- [2] S.-J. Liu, P. Wang, Q. Zhao, H.-Y. Yang, J. Wong, H.-B. Sun, X.-C. Dong, W.-P. Lin, W. Huang, *Adv. Mater* 2012, 24, 2901.
- [3] C. M. Lieber, W. Lu, *Nat. Mater.* 2010, 6, 841.
- [4] A. M. Mahmoud, A. J. Bergren, N. Pekas, R. L. McCreery, *Adv. Funct. Mater.* 2011, 21, 2273.
- [5] H. Song, M. A. Reed, T. Lee, *Adv. Mater* 2011, 23, 1583.
- [6] K. Moth-Poulsen, T. Bjørnholm, *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, 551.
- [7] R. R. Birge, N.B. Gillespie, E. W. Izaguirre, A. Kusnetzow, A. F. Lawrence, D. Singh, Q. W. Song, E. Schmidt, J. A. Stuart, *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 10746.
- [8] A. Noy, *Adv. Mater.* 2011, 23, 807.
- [9] B. H. Robinson, N. C. Seeman, *Protein Eng.* 1987, 1, 295.
- [10] F. C. Simmel, *ACS Nano* 2013, 7, 6.
- [11] J.-W. Choi, B.-K. Oh, J. Min, Y. J. Kim, *Appl. Phys. Lett.* 2007, 91, 263902.

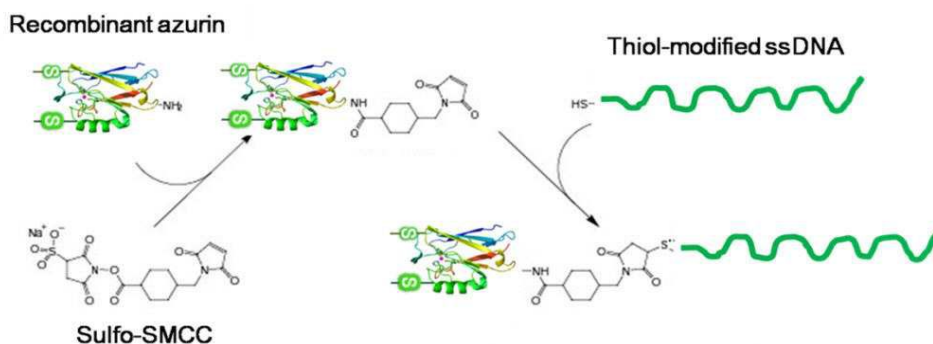
- [0130] [12] T. Lee, S.-U. Kim, J. Min, J.-W. Choi, *Adv. Mater.* 2010, 22, 510.
- [0131] [13] T. Lee, S.-U. Kim, J. Min, J.-W. Choi, *Biomaterials* 2011, 32, 3815.
- [0132] [14] A. K. Yagati, T. Lee, J. Min, J.-W. Choi, *Biosens. Bioelectron.* 2013, 40, 283.
- [0133] [15] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature* 2010, 465, 202.
- [0134] [16] G. D. Ruiter, M. E. Van der Boom, *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 563.
- [0135] [17] M. Amrute-Nayak, R. P. Diensthuber, W. Steffen, D. Kathmann, F. K. Hartmann, R. Fedorov, C. Urbanke, D. J. Manstein, B. Brenner, G. Tsiavalariis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 312 .
- [0136] [18] P. N. Bartlett, *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*. Wiley, UK 2008, p. 424.
- [0137] [19] T. Pawlowski, J. Swiatek, K. Gasiorowski, H. Kozłowski, *Inorg. Chem. Acta.* 1987, 136, 185.
- [0138] [20] P. Bhyrappa, M. Sankar, B. Varghese, *Inorg. Chem.* 2006, 45, 4136.
- [0139] [21] I. Delfino, S. Cannistraro, *Biophys. Chem.* 2009, 139, 1.
- [0140] [22] D. Katz, O. Millo, S. Kan, U. Banin, *Appl. Phys. Lett.* 2001, 79, 117.

[0141] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

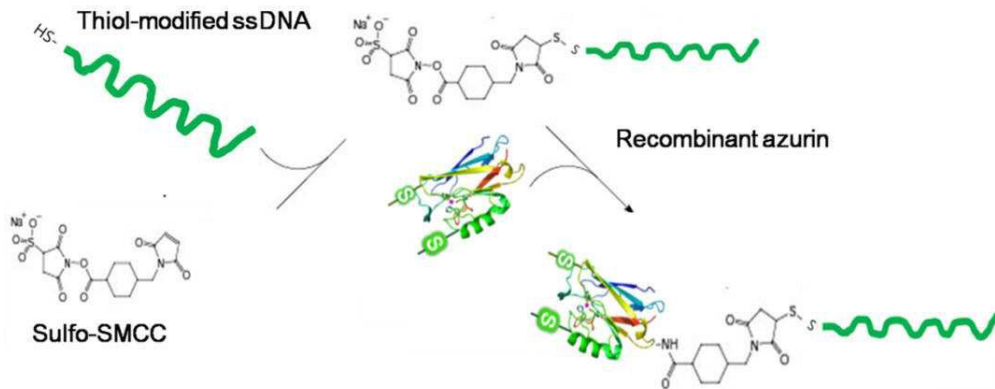
도면1a

(a) Case 1



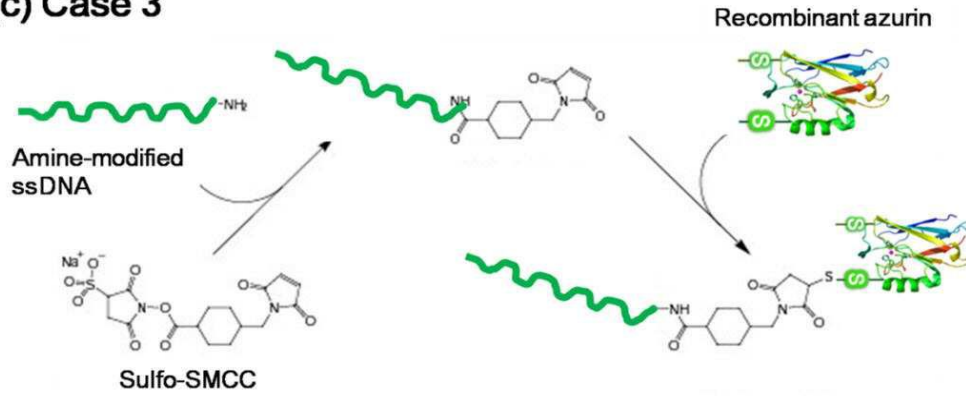
도면1b

(b) Case 2



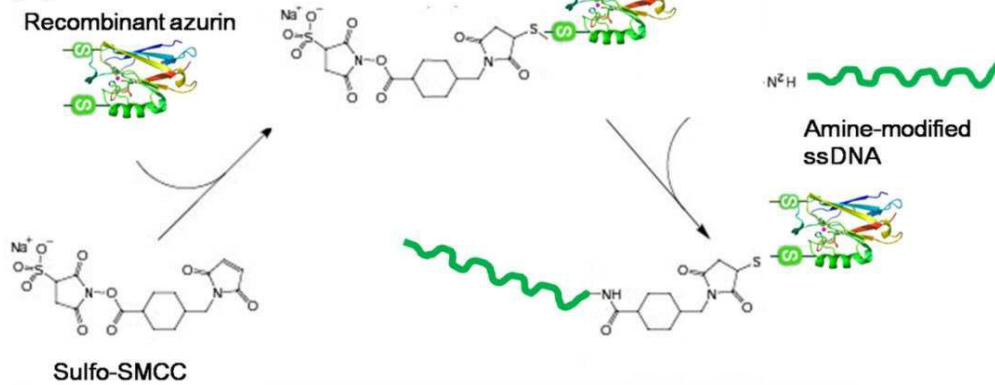
도면1c

(c) Case 3

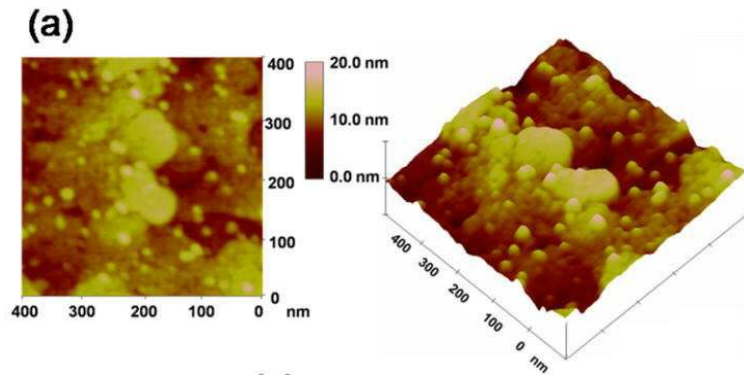


도면1d

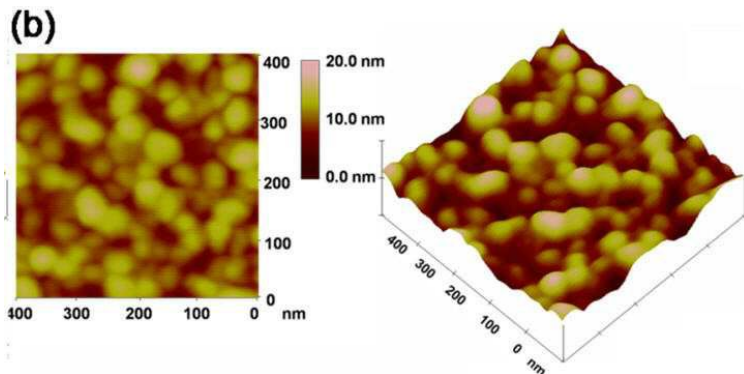
(d) Case 4



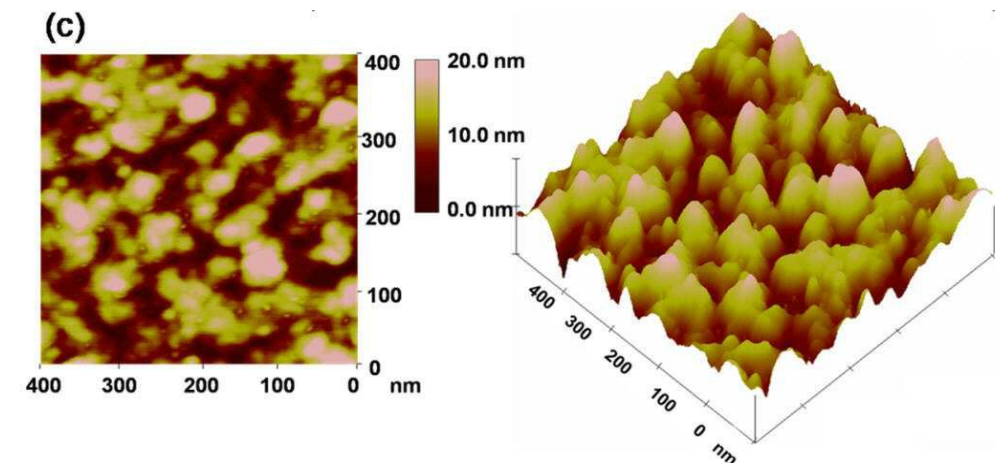
도면2a



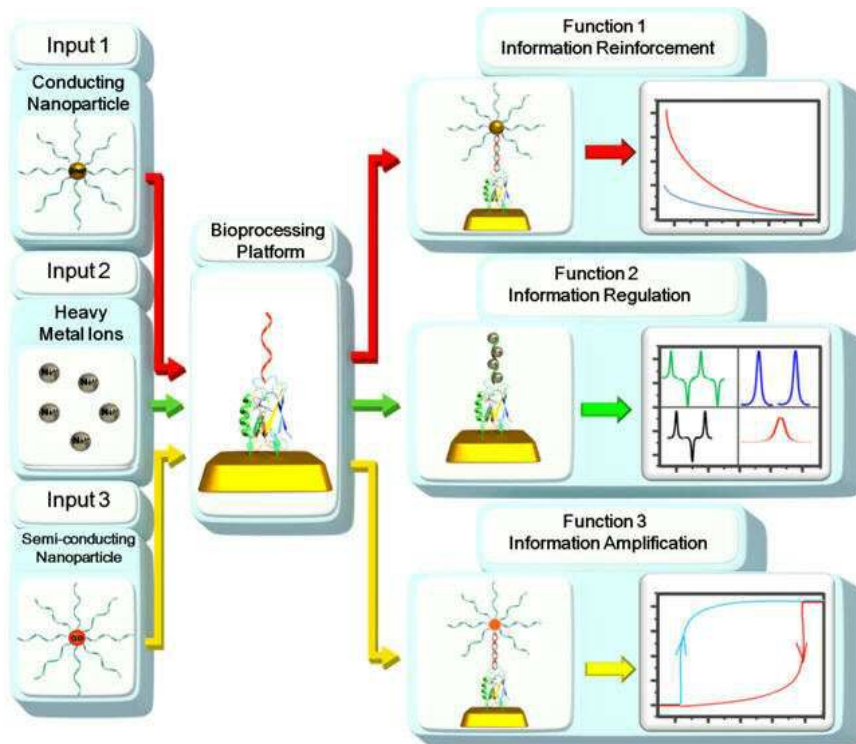
도면2b



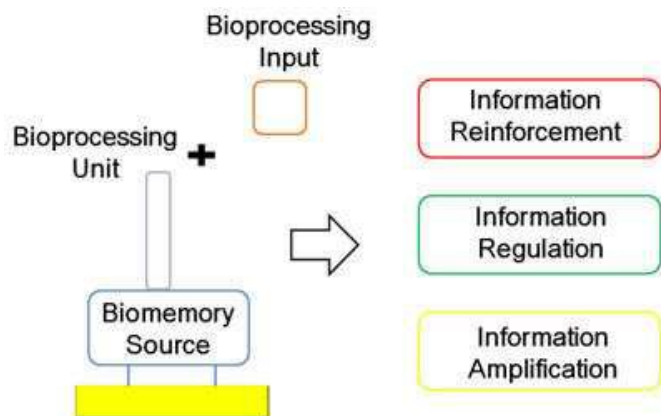
도면2c



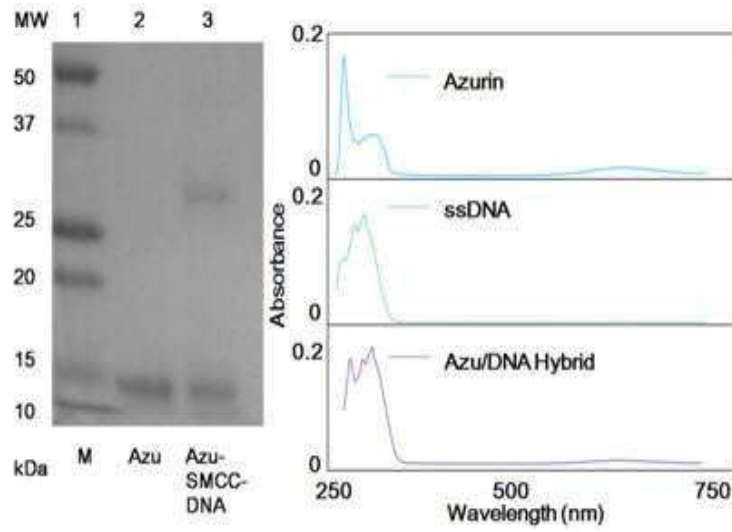
도면3a



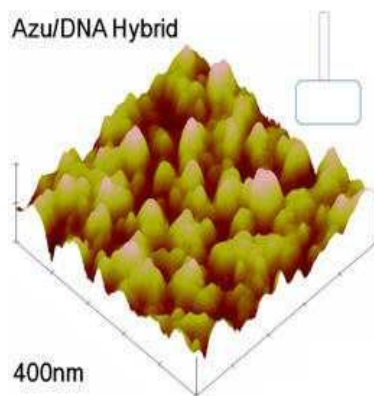
도면3b



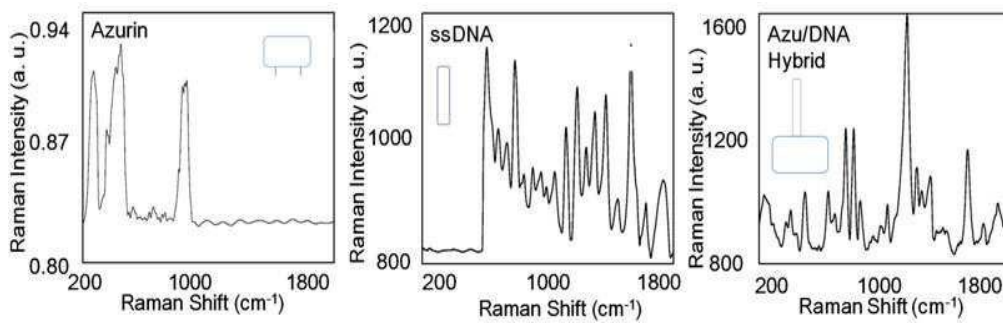
도면3c



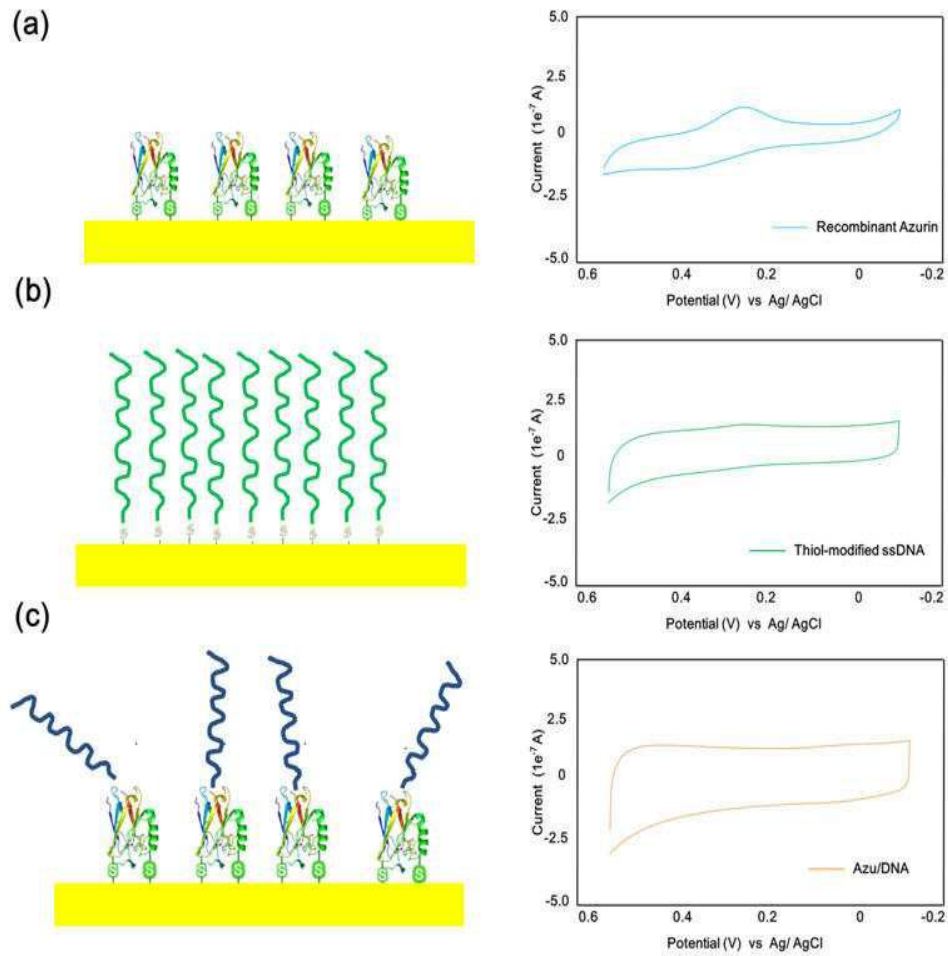
도면3d



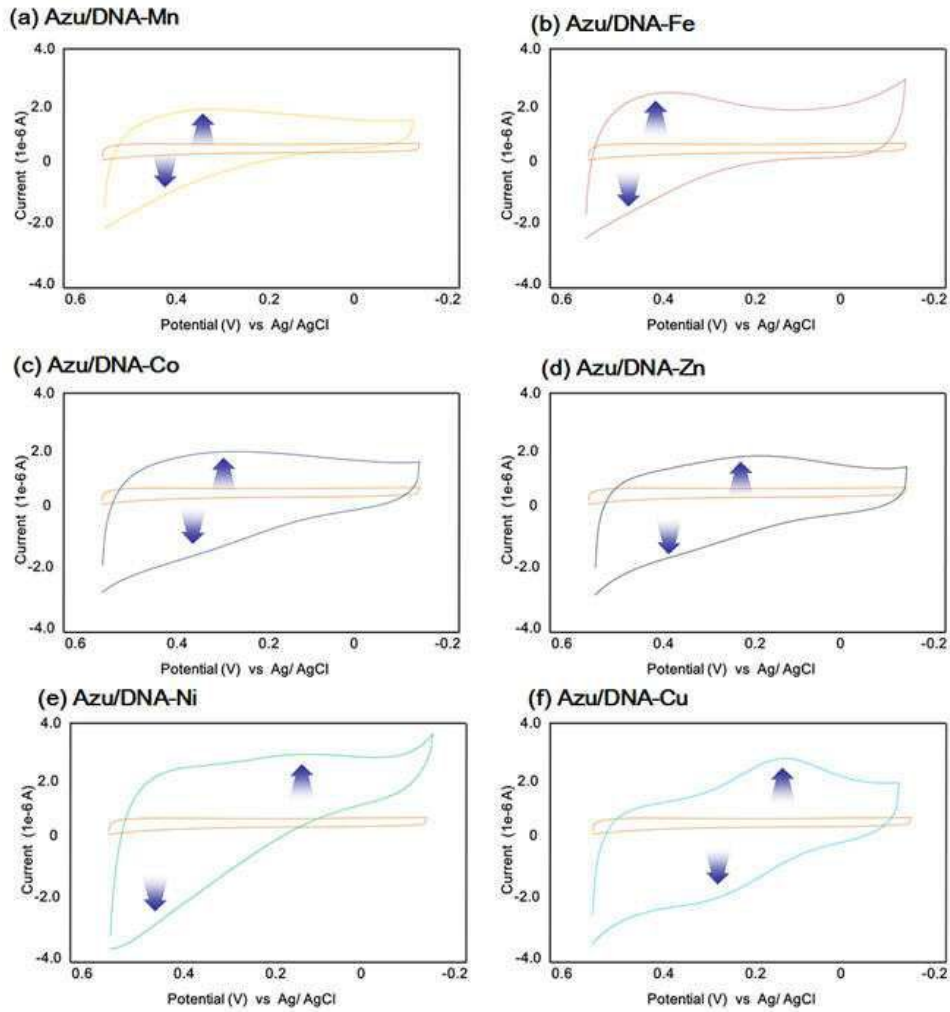
도면3e



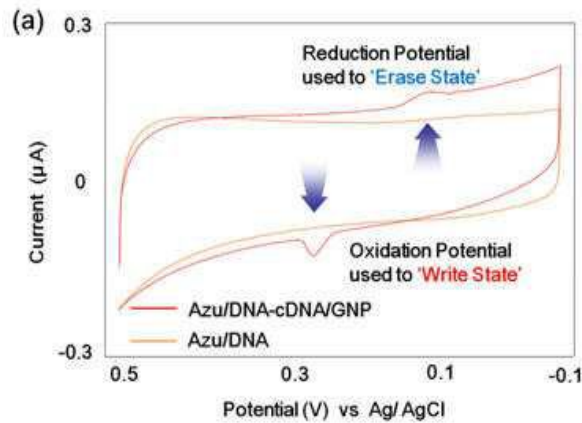
도면4



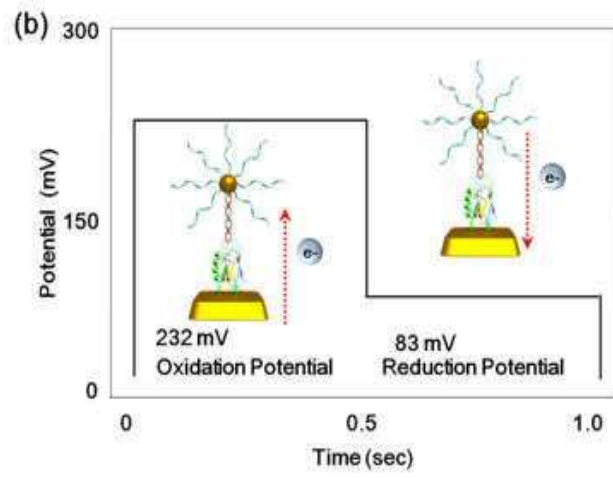
도면5



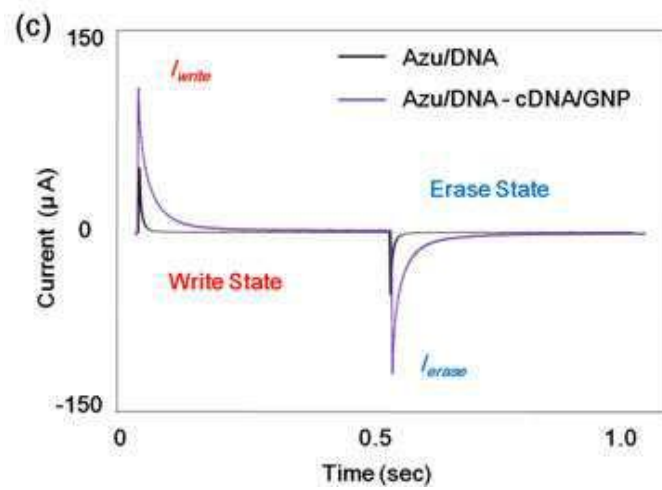
도면6a



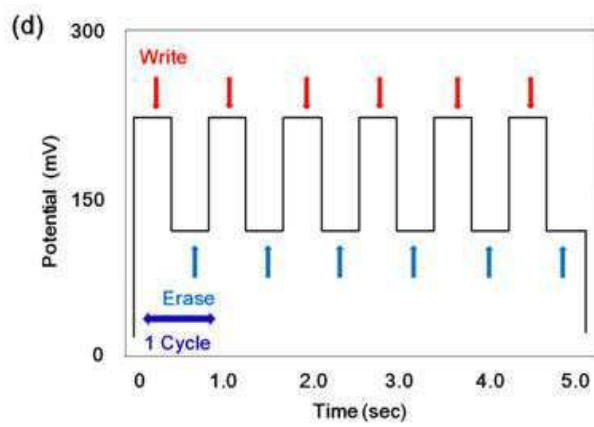
도면6b



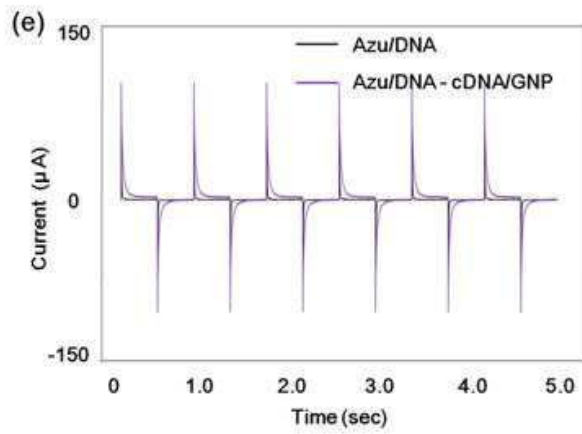
도면6c



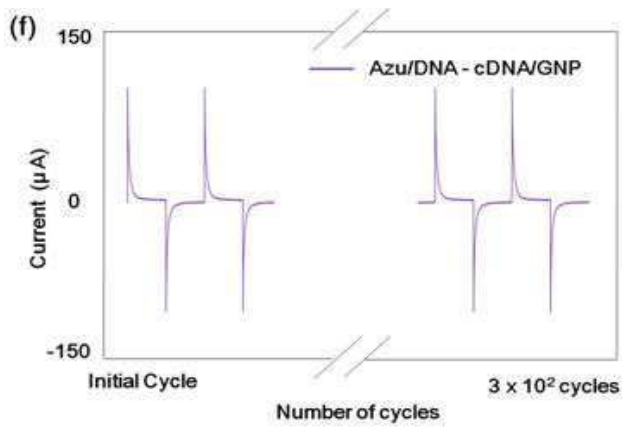
도면6d



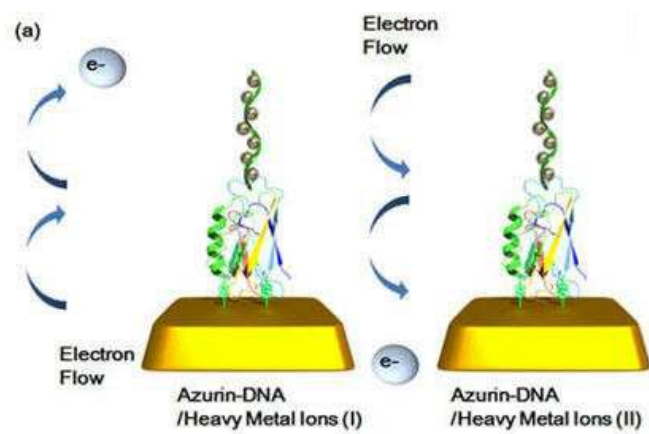
도면6e



도면6f



도면7a



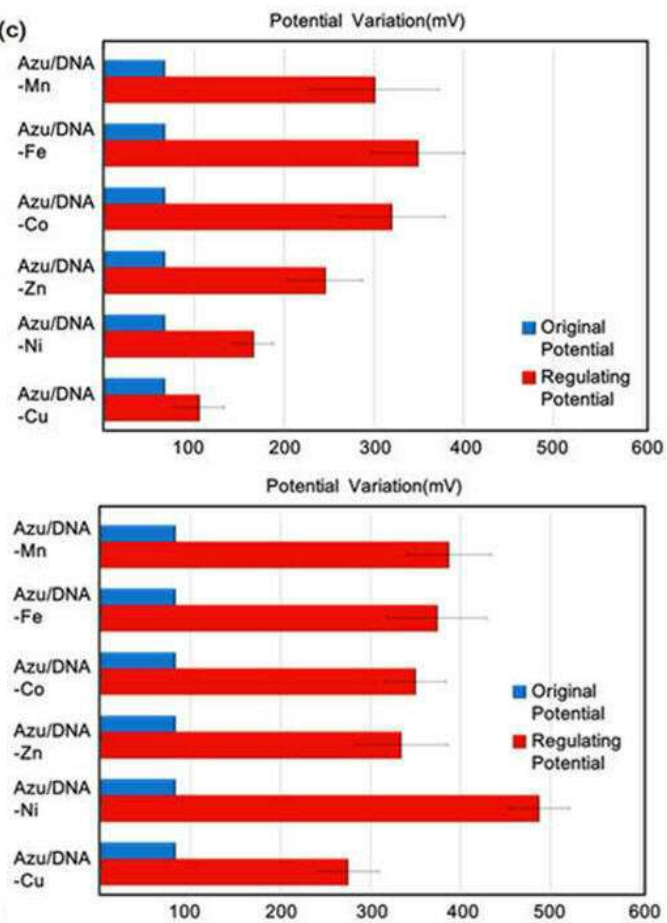
도면7b

(b)

Input	RP (mV)	OP (mV)	Regulated Current (μ C)
Mn	305 $\pm$ 71	413 $\pm$ 47	0.37 $\pm$ 0.12
Fe	349 $\pm$ 52	374 $\pm$ 55	0.51 $\pm$ 0.13
Co	320 $\pm$ 59	350 $\pm$ 34	0.56 $\pm$ 0.28
Zn	246 $\pm$ 41	334 $\pm$ 52	1.59 $\pm$ 0.41
Ni	140 $\pm$ 22	437 $\pm$ 71	4.10 $\pm$ 0.59
Cu	106 $\pm$ 27	275 $\pm$ 34	1.33 $\pm$ 0.34

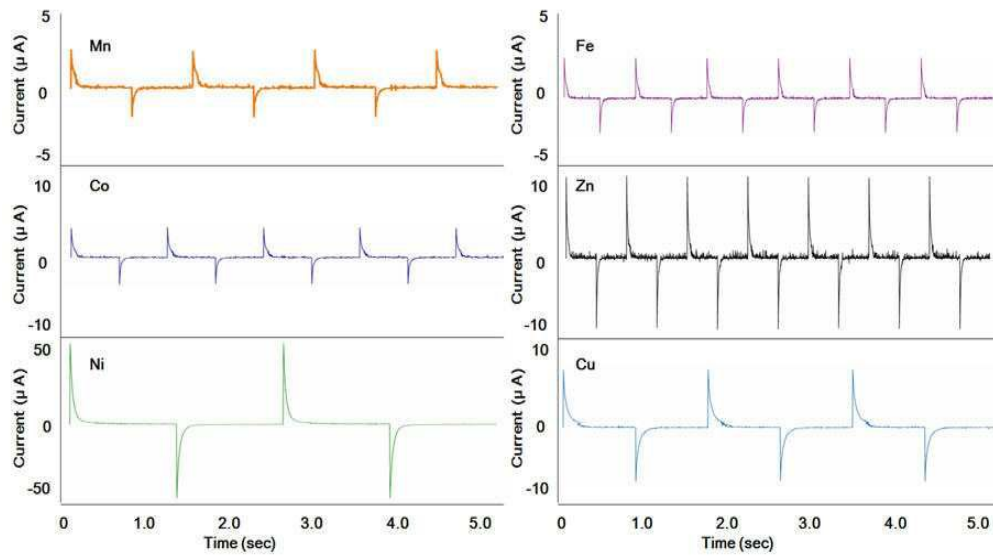
도면7c

(c)

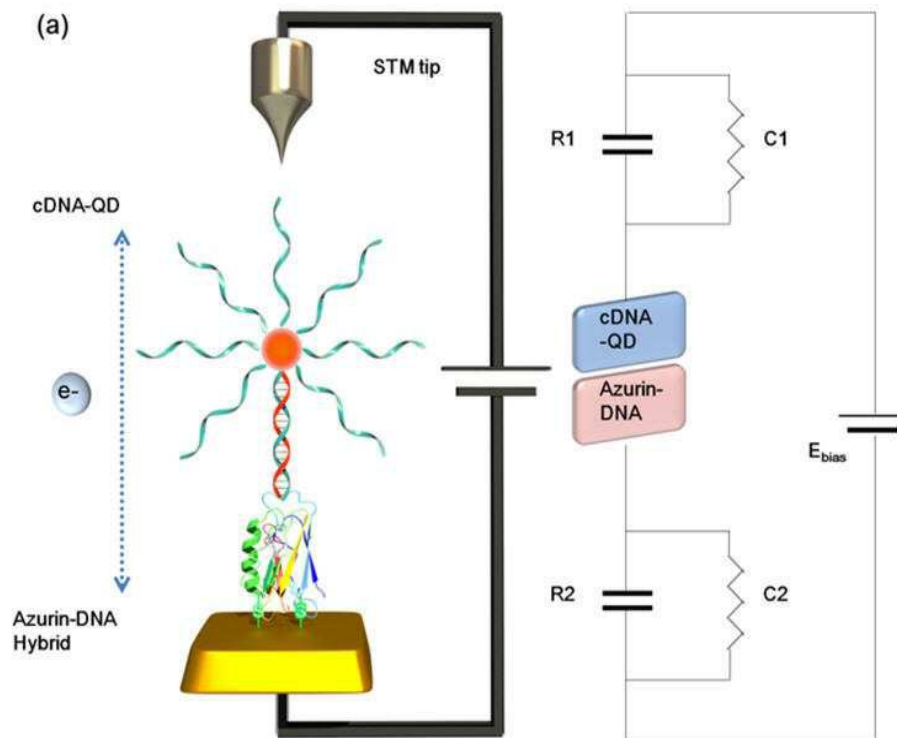


도면7d

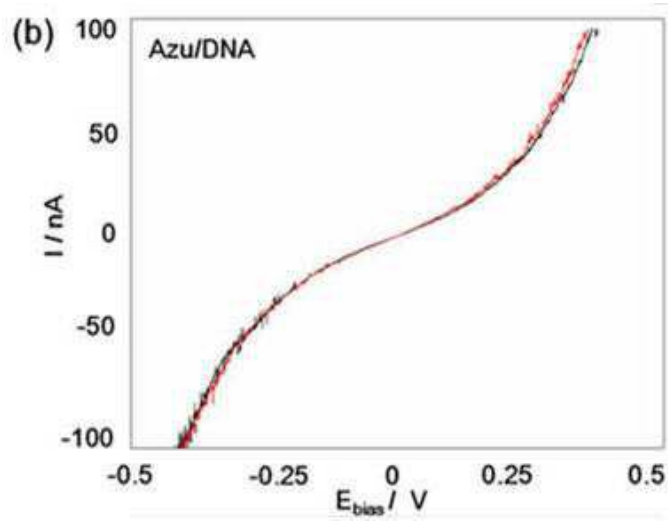
(d)



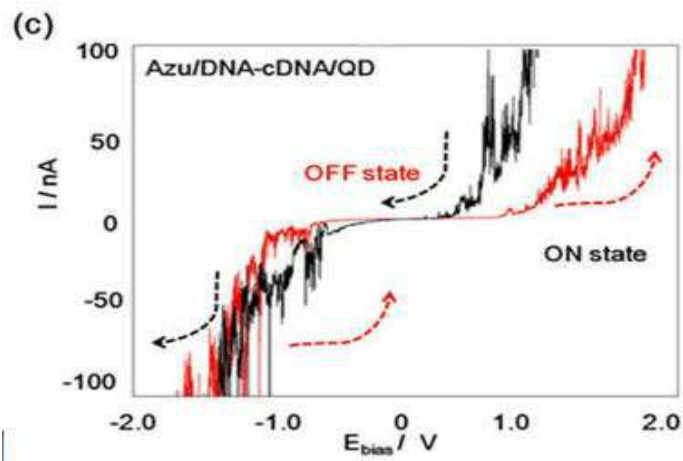
도면8a



도면8b



도면8c



도면8d

