

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0056313 (43) 공개일자 2012년06월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 9/96 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01) G01N 27/327 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0117118 (22) 출원일자 2010년11월23일 심사청구일자 2010년11월23일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 오민규 서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 104동 605호 김중배 서울특별시 강남구 역삼로 309, 래미안 펜타빌 아파트 101동 1501호 (역삼동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인주원

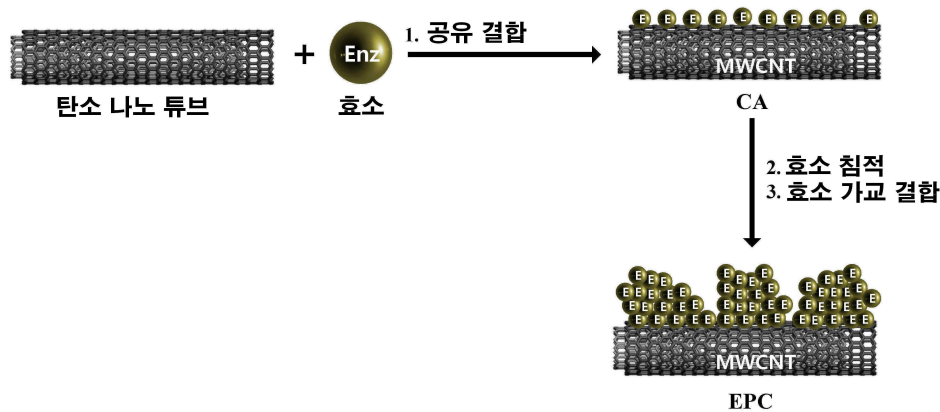
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 효소가 집적된 미세튜브를 포함한 논리게이트용 고정화 효소복합체

(57) 요약

본 발명은 여러 종류의 효소가 집적된 미세튜브로 이루어진 논리게이트용 고정화 효소복합체 및 그 제조방법, 그리고 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체를 포함한 논리게이트에 관한 것이다. 구체적으로 다중벽 탄소나노튜브 (multi-walled carbon nanotube)와 같은 미세튜브 표면에 포도당 산화효소 (glucose oxidase), 인버타아제(invertase), 서양고추냉이 과산화효소 (horseradish peroxidase)와 같은 2 종 이상의 효소들을 집적, 고정화한 논리게이트용 고정화 효소복합체 및 이와 같은 제조방법, 그리고 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체를 유리탄소전극과 같은 전극에 구비한 논리게이트에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김경우

서울특별시 성북구 종암로23길 35, 202동 805호
(종암동, 래미안 세레니티)

김병찬

서울특별시 관악구 관악로30길 27, 104동 2201호
(봉천동, 관악푸르지오아파트)

이혜진

서울특별시 동대문구 무학로 193, 404호 (용두동, 삼영 오피스텔)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	K20902001448-10E0100-03010
부처명	한국연구재단
연구사업명	해외우수연구기관유치사업
연구과제명	바텔연구소 유치활용을 통한 급성 호흡기 감염 및 중증 패혈증 조기 진단용 나노바이오
시스템 개발	
주관기관	고려대학교
연구기간	2010.07.01 ~ 2011.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010K001315
부처명	한국연구재단
연구사업명	신기술융합형 성장동력사업
연구과제명	고활성, 고안정 나노-단백질 원천기술 개발 및 ELISA에서의 응용
주관기관	고려대학교
연구기간	2010.07.01 ~ 2011.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20100016464
부처명	한국연구재단
연구사업명	(이공)일반연구자지원-기본연구
연구과제명	트립신 가수분해와 바이오연료전지를 위한 나노효소코팅의 안정성 및 활성 기작에 대한
연구	
주관기관	고려대학교
연구기간	2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

(A) 2 내지 5 종류의 효소를 미세튜브와 혼합하여 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 결합된 효소-미세튜브를 제조하고, 여기서 상기 미세튜브와 상기 효소의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지는 단계;

(B) 상기 효소 및 미세튜브의 혼합물에 염을 첨가하여 상기 효소를 서로 뭉치게 하는 단계; 및

(C) 상기 효소 및 미세튜브의 혼합물에 아민 결합 2 관능성 화합물을 첨가하여 상기 효소를 서로 가교결합시켜, 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브를 제조하는 단계

를 포함하는 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (A) 이전에,

(D) 상기 미세튜브의 표면을 산으로 처리하는 단계

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (C) 이후에,

(E) 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브 중 효소 또는 미세튜브의 미반응 결합부위를 보호하는 단계

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법.

청구항 4

미세튜브; 및

상기 미세튜브의 표면에 집적된 2 내지 5 종류의 효소

를 포함하고,

상기 미세튜브와 상기 효소의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지고,

상기 미세튜브 표면의 효소 집적은 염, 아민 결합 2 관능성 화합물, 또는 염 및 아민 결합 2 관능성 화합물에 의해 이루어지는 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 미세튜브는 상기 효소의 집적 전에 산으로 처리된 것을 특징으로 하는 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브 중 효소 또는 미세튜브의 미반응 결합부위는 보호된 것을 특징으로 하는 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 7

청구항 4에 있어서,

상기 미세튜브는 탄소나노튜브인 것을 특징으로 하는 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 8

청구항 4에 있어서,

상기 효소는 포도당 산화효소, 인버타아제(invertase), 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 탈수소효소, 카탈라아제, 아밀로글루코시다아제, 젖산 산화효소, 및 에스테라아제로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 9

청구항 4에 있어서,

상기 미세튜브 표면의 효소 집적을 위한 염은 암모늄 설페이트, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트, 포타슘 포스페이트 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 10

청구항 4에 있어서,

상기 미세튜브 표면의 효소 집적을 위한 아민 결합 2 관능성 화합물은 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르), 디이소시아네이트, 디아시드 클로라이드 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 11

청구항 4에 있어서,

상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물은 다른 한 종류의 효소의 효소반응 생성물의 존재 하에서만 생성되는 것을 특징으로 하는 AND 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 효소는 포도당 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 탈수소효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 산화효소 및 카탈라아제, 아밀로글루코시다아제 및 포도당 탈수소효소, 또는 젖산 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소인 것을 특징으로 하는 AND 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 13

청구항 4에 있어서,

상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물은 다른 한 종류의 효소의 효소반응 생성물과 동일한 것을 특징으로 하는 OR 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 14

청구항 4에 있어서,

상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물은 다른 한 종류의 효소의 효소반응의 기질인 것을 특징으로 하는 OR 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 효소는 포도당 산화효소 및 인버타아제, 아밀로글루코시다아제 및 인버타아제, 포도당 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 또는 에스테라아제 및 포도당 산화효소인 것을 특징으로 하는 OR 논리게이트용 고정화 효소복합체.

청구항 16

청구항 4 내지 청구항 10 중 어느 한 청구항의 논리게이트용 고정화 효소복합체를 포함하는 논리게이트.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

분광광도계(spectrophotometer)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 논리게이트.

청구항 18

청구항 16에 있어서,

청구항 4 내지 청구항 10 중 어느 한 청구항의 논리게이트용 고정화 효소복합체를 포함하는 3 전극 전지를 포함하는 것을 특징으로 하는 논리게이트.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 여러 종류의 효소가 집적된 미세튜브로 이루어진 논리게이트용 고정화 효소복합체 및 그 제조방법, 그리고 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체를 포함한 논리게이트에 관한 것이다. 구체적으로 다중벽 탄소나노튜브 (multi-walled carbon nanotube)와 같은 미세튜브 표면에 포도당 산화효소 (glucose oxidase), 인버타아제(invertase), 서양고추냉이 과산화효소 (horseradish peroxidase)와 같은 2 종 이상의 효소들을 집적, 고정화한 논리게이트용 고정화 효소복합체 및 이와 같은 제조방법, 그리고 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체를 유리탄소전극과 같은 전극에 구비한 논리게이트에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

논리게이트는 한 개 혹은 여러 개의 논리 입력신호를 통해 논리적 연산을 수행하고 이에 따라 단일 논리 출력신호를 생성하는 것을 말한다. 일반적으로 불리언(boolean) 논리 연산에 기초하고 있고 디지털 회로에서 많이 사용되고 있다. 일반적으로 불리언 논리 연산을 통한 논리게이트는 False, AND, NOT A, NOT B, XOR, OR, NOR, NAND, True와 같은 종류들이 있다.

[0003]

종래 논리게이트는 논리 수준이 전압이나 전류의 변화에 의해서 결정되는 전기적 시스템으로 이루어졌다. 이러한 기존의 전기적 컴퓨팅 시스템과는 다른 컴퓨팅 시스템을 개발하고자 하는 연구가 관심을 받아왔고 이에 화학적 컴퓨팅 시스템과 같은 기술이 개발되었다. 화학적 컴퓨팅 시스템은 입력신호로 빛, 자성, 전기화학적 포텐셜, pH 변화 등과 같은 물리적 혹은 화학적 신호를 사용하는데 이러한 화학적 논리 시스템들은 다중 구성 논리 시스템을 구축하기가 매우 까다롭기 때문에 어려움이 많고, 또한 복잡하고 정교한 초분자체가 필요하다는 단점을 갖는다. 기존의 전기적 컴퓨팅 시스템이 거의 완성단계에 올라 있는 기술이며 최적화되어 있기 때문에, 복잡한 구성과 초분자체들이 필요한 화학적 컴퓨팅 시스템을 비교하였을 때 그 응용가능성이 떨어진다. 이를 개선하기 위해서 새롭게 각광을 받는 것이 생체분자를 이용한 바이오 컴퓨팅 시스템이다. 바이오 컴퓨팅 시스템은 생물체가 기본적으로 가지고 있는 생물학적 프로세스를 기반으로 하고 있기 때문에 화학적 컴퓨팅에 비해서 좀 더 복잡한 정보처리가 가능하다. 바이오 컴퓨팅 시스템은 주로 DNA, RNA, 펩타이드, 단백질 혹은 박테리아 세포와 같은 것들로 구성되어 있다. 생체체 내에서 이것들이 자연적으로 가지는 작용들을 이용하며, 특히 특정조건에서 활성화되는 효소를 이용한 바이오 컴퓨팅 기술이 최근 주목을 받고 있다. 특정 기질과 반응하는 효소작용을 이용하여 불리언(Boolean) 논리 연산을 수행하는 정보처리가 가능하기 때문에 시스템의 제어 및 적용이 용이하다는 장점을 갖는다. 기존의 효소를 이용한 논리게이트 시스템은 E. Katz 교수가 첫 착안하였으나, 입력신호로써 효소를 직접 사용하는 한계를 갖고 있었다. 구체적으로, 효소를 직접 사용하는 경우 효소 활성 및 안정성이 보장되지 않으면 시스템 전체의 기능 및 안정성에도 문제점이 발생하게 된다는 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 효소를 이용한 논리게이트를 구축하는데 있어서 미세튜브 표면 위에 효소를 집적하여 고정화함으로써 기존과 달리 효소의 안정화를 통한 안정적인 시스템을 구축하고, 분광학적 또는 전기화학적 측정 방법을 통해 좀 더 측정이 용이한 논리게이트를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0005] 또한, 본 발명은 상기 논리게이트에 포함되는 논리게이트용 고정화 효소복합체를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0006] 또한, 본 발명은 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법은 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여,
- [0008] (A) 2 내지 5 종류의 효소를 미세튜브와 혼합하여 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 결합된 효소-미세튜브를 제조하고, 여기서 상기 미세튜브와 상기 효소의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphhydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지는 단계;
- [0009] (B) 상기 효소 및 미세튜브의 혼합물에 염을 첨가하여 상기 효소를 서로 뭉치게 하는 단계; 및
- [0010] (C) 상기 효소 및 미세튜브의 혼합물에 아민 결합 2 관능성 화합물을 첨가하여 상기 효소를 서로 가교결합시켜, 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브를 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명의 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법은 상기 단계 (A) 이전에,
- [0012] (D) 상기 미세튜브의 표면을 산으로 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법은 상기 단계 (C) 이후에,
- [0014] (E) 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브 중 효소 또는 미세튜브의 미반응 결합부위를 보호하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법은 상기 단계 (C), 단계 (D), 단계 (E), 단계 (C) 및 단계 (D), 단계 (C) 및 단계 (E), 단계 (D) 및 단계 (E), 또는 단계 (C) 및 단계 (D) 및 단계 (E) 이후에, 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0016] 한편, 본 발명의 논리게이트용 고정화 효소복합체는
- [0017] 미세튜브; 및
- [0018] 상기 미세튜브의 표면에 집적된 2 내지 5 종류의 효소를 포함하고,
- [0019] 상기 미세튜브와 상기 효소의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphhydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지고,
- [0020] 또한, 상기 미세튜브 표면의 효소 집적은 염, 아민 결합 2 관능성 화합물, 또는 염 및 아민 결합 2 관능성 화합물에 의해 이루어질 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 미세튜브는 상기 효소의 집적 전에 산으로 처리될 수 있다.

- [0026] 또한, 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브 중 효소 또는 미세튜브의 미반응 결합부위는 보호될 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 미세튜브는 탄소나노튜브인 것이 바람직하다.
- [0028] 또한, 상기 미세튜브는 다중벽 탄소나노튜브인 것이 바람직하다.
- [0029] 또한, 상기 효소는 포도당 산화효소, 인버타아제(invertase), 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 탈수소효소, 카탈라아제, 아밀로글루코시다아제, 젖산 산화효소, 및 에스테라아제로 이루어진 군에서 선택된 것이 바람직하다.
- [0030] 또한, 상기 미세튜브 표면의 효소 집적을 위한 염은 암모늄 설페이트, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트, 포타슘 포스페이트 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것이 바람직하다.
- [0031] 또한, 상기 미세튜브 표면의 효소 집적을 위한 아민 결합 2 관능성 화합물은 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르), 디이소시아네이트, 디에시드 클로라이드 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것이 바람직하다.
- [0032] 한편, 본 발명의 AND 논리게이트용 고정화 효소복합체는 상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물이 다른 한 종류의 효소의 효소반응 생성물의 존재 하에서만 생성되는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 또한, 본 발명의 AND 논리게이트용 고정화 효소복합체의 상기 효소는 포도당 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 탈수소효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 산화효소 및 카탈라아제, 아밀로글루코시다아제 및 포도당 탈수소효소, 또는 젖산 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소인 것이 바람직하다.
- [0034] 한편, 본 발명의 OR 논리게이트용 고정화 효소복합체는 상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물이 다른 한 종류의 효소의 효소반응 생성물과 동일한 것을 특징으로 한다.
- [0035] 한편, 본 발명의 OR 논리게이트용 고정화 효소복합체는 상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물은 다른 한 종류의 효소의 효소반응의 기질인 것을 특징으로 한다.
- [0036] 또한, 본 발명의 OR 논리게이트용 고정화 효소복합체의 상기 효소는 포도당 산화효소 및 인버타아제, 아밀로글루코시다아제 및 인버타아제, 포도당 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 또는 에스테라아제 및 포도당 산화효소인 것이 바람직하다.
- [0037] 한편, 본 발명의 논리게이트는 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0038] 또한, 본 발명의 논리게이트는 분광광도계(spectrophotometer)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 논리게이트는 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체를 포함하는 3 전극 전지를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명의 논리게이트는 여러 효소들을 탄소나노튜브와 같은 미세튜브에 고정화함으로써 효소의 안정성을 향상시키고 그 결과 논리게이트 자체의 안정성까지 향상시키는 효과가 있다. 이는 논리게이트 자체의 수명을 늘리는 효과 또한 지니고 있다. 나아가, 상기 논리게이트는 분광학적 또는 전기화학적 방법으로 간단하게 측정함으로써 시스템 운용 효율을 향상시키는 장점이 있다. 기존의 효소 기반 논리게이트는 유리(free) 효소를 사용하였기 때문에, 효소의 안정성이 저하될 우려가 있고 시스템 운용면에서도 단점을 갖고 있었다. 하지만 본 발명의 논리게이트는 많은 효소들을 집적하고 이것을 미세튜브에 고정화함으로써 유리 효소에 비해 수배에서 수십배의 안정성 및 활성 향상을 확보하였고 그 결과 시료의 농도가 낮아도 검출이 가능하여 민감도가 향상되었다. 기존의 분광학적 측정방법 외에도 전기화학적 방법으로 측정이 가능하기 때문에 향후 진단 센서로서의 응용이 용이하다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 본 발명의 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조방법을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 AND 논리게이트의 작동과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 AND 논리게이트의 각 입력에 대한 흡광도 출력신호를 파장 변화에 따라 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 AND 논리게이트의 각 입력에 대한 흡광도 출력신호의 막대그래프이다.

도 5는 본 발명의 OR 논리게이트의 작동과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 OR 논리게이트의 각 입력에 대한 흡광도 출력신호를 파장 변화에 따라 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 OR 논리게이트의 각 입력에 대한 흡광도 출력신호의 막대그래프이다.

도 8은 본 발명의 OR 논리게이트의 입력신호에 대한 전류값 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 OR 논리게이트의 입력신호에 대한 순환 전압전류 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명의 OR 논리게이트의 입력신호에 대한 순환 전압전류 변화를 표시한 막대그래프이다.

도 11은 포도당 산화효소에 있어서 공유결합 단계와 침적-가교결합된 단계 사이의 활성 및 안정성 차이를 나타낸 그래프이다.

도 12는 서양고추냉이 과산화효소에 있어서 공유결합 단계와 침적-가교결합된 단계 사이의 활성 및 안정성 차이를 나타낸 그래프이다.

도 13은 인버타아제에 있어서 공유결합 단계와 침적-가교결합된 단계 사이의 활성 및 안정성 차이를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 첨부도면을 참조하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명은 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0043] 효소의 침적을 통해 효소 자체의 안정화 및 그 활성을 유지함으로써 논리게이트 자체의 안정을 도모하는 본 발명은 그에 사용되는 논리게이트용 고정화 효소복합체의 제조를 위해 먼저 2 내지 5 종류의 효소를 미세튜브와 혼합하여 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 결합된 효소-미세튜브를 제조하는 단계로부터 시작된다.
- [0044] 이때 효소와 미세튜브 사이의 결합은 공유결합인 것이 바람직하고, 특히 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합인 것이 더욱 바람직하다.
- [0045] 이처럼 효소와 미세튜브 사이의 결합을 더욱 촉진하기 위해 상기 미세튜브의 표면을 산으로 처리하는 단계를 먼저 거치는 것이 더욱 바람직한데, 미세튜브 표면을 산, 특히 강산인 질산과 황산의 혼합물로 처리하면 표면에 카르복실기 (-COOH)가 형성되고, 이는 효소 표면의 아민기 (-NH₂)와 반응하여 공유결합이 형성되는 것이다.
- [0046] 그러나, 미세튜브의 표면에 공유결합되는 효소는 미세튜브와 직접 접하는 1 개의 층에 불과하므로, 다량의 효소를 침적시킬 수 없어 감도가 낮고 제품 수명이 짧게 된다. 따라서, 이러한 단점을 극복하기 위해서는 다량의 효소를 미세튜브 표면으로 모아야 하는데 먼저 염을 이용하여 상기 효소들을 미세튜브 표면으로 침적시키는 것이 필요하다. 이때 사용되는 염은 암모늄 설페이트, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트, 포타슘 포스페이트 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것이 바람직하다.
- [0047] 나아가, 이렇게 뭉쳐진 효소들을 서로 가교결합시켜 보다 안정된 시스템을 만들기 위해 아민 결합 2 관능성 화합물을 첨가하게 된다. 본 발명에서는 상기 아민 결합 2 관능성 화합물로서 특히 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미드 에스테르), 디이소시아네이트, 디에시드 클로라이드 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것이 바람직하다.
- [0048] 이처럼 침적 및 가교결합을 통해 미세튜브에 효소를 완전히 고정화시키면 효소 또는 미세튜브의 미반응 결합 부위를 보호하는 단계를 추가로 거치는 것이 바람직하다. 이러한 미반응 작용기 보호를 통해 분석의 오류를

예방하고 안정성 등을 더욱 향상시킬 수 있다.

[0049] 마찬가지로 취지로 각 단계 직후에 완충액 등으로 세척하여 의도하지 않는 반응물로 인한 오염을 예방하는 것이 바람직하다.

[0050] 본 발명에 포함되는 상기 미세튜브는 특별히 제한되지 않으나, 탄소나노튜브, 특히 다중벽 탄소나노튜브인 것이 바람직하다.

[0051] 그리고, 본 발명에 포함되는 상기 효소는 포도당 산화효소, 인버타아제(invertase), 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 탈수소효소, 카탈라아제, 아밀로글루코시다아제, 젖산 산화효소, 및 에스테라아제로 이루어진 군에서 선택된 것이 바람직하다.

[0052] 한편, 본 발명의 논리게이트용 고정화 효소복합체 중 AND 논리게이트용 고정화 효소복합체는 상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물이 다른 한 종류의 효소의 효소반응 생성물의 존재 하에서만 생성되는 것이 바람직하며, 예컨대 포도당 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 탈수소효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 포도당 산화효소 및 카탈라아제, 아밀로글루코시다아제 및 포도당 탈수소효소, 또는 젖산 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소의 조합을 들 수 있다.

[0053] 그리고, 본 발명의 논리게이트용 고정화 효소복합체 중 OR 논리게이트용 고정화 효소복합체는 상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물이 다른 한 종류의 효소의 효소반응 생성물과 동일한 것이 바람직하다.

[0054] 또는, 본 발명의 OR 논리게이트용 고정화 효소복합체는 상기 효소 중 어느 한 종류의 효소의 효소반응 생성물은 다른 한 종류의 효소의 효소반응의 기질인 것이 바람직하며, 예컨대 포도당 산화효소 및 인버타아제, 아밀로글루코시다아제 및 인버타아제, 포도당 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소, 또는 에스테라아제 및 포도당 산화효소의 조합을 들 수 있다.

[0055] 한편, 본 발명의 논리게이트는 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체를 포함하하며, 그 밖에 검출수단으로서 분광광도계(spectrophotometer)를 추가로 포함할 수도 있다.

[0056] 분광학적 방법이 아닌 전기화학적 방법으로 검출을 용이하게 하기 위해 본 발명의 논리게이트는 상기 논리게이트용 고정화 효소복합체를 포함하는 3 전극 전지를 포함할 수 있다. 이 경우 대 시간 전류방법(chronoamperometry method) 또는 순환 전압전류측정법(cyclic voltametry method)을 이용하여 실시간으로 논리게이트를 작동시킬 수 있다.

[0057] 이하, 본 발명의 실시예에 대하여 설명한다.

[0058] 실시예

[0059] 제조예 : 다중벽 탄소나노튜브에 효소복합체 형성

[0060] 세 효소(포도당 산화효소, 인버타아제, 및 서양고추냉이 과산화효소)의 고정화 효소복합체가 도 1의 세 단계 공정에 의해 제조되었다. 먼저, 효소는 산으로 처리된 EDC로 활성화된 탄소나노튜브에 공유결합되었다(CA : covalent attachment). 그 다음 효소는 적당량의 암모늄 설페이트를 첨가하여 침적시켰다. 마지막으로, GA 용액을 첨가하여 탄소나노튜브 상에 침적된 효소분자를 서로 가교결합시켰다(EPC : enzyme precipitate coating). 구체적으로, 황산 : 질산이 3 : 1 (부피)인 혼합 산에 처리하여 다중벽 탄소나노튜브(외경 30 ± 15 nm, 길이 1 내지 5 μ m, 순도 > 95 %, Nanolab, Inc. USA) 표면에 카르복실기를 형성시켰다. 상기 산으로 처리된 탄소나노튜브를 53.2 mM EDC (N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드, Pierce, USA) 및 434 mM NHS (N-하이드록시술소숙신이미드, Alfa Aesar, USA)를 함유한 MES 완충액(pH 6.5) 100 mM 에 현탁하고, 상온에서 1 시간 동안 교반했다. MES 완충액(pH 6.5) 100 mM 로 세척한 후, EDC-활성 탄소나노튜브를 10 mg/ml 농도의 각 효소 혼합액에 넣고 교반(100 rpm)하며 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 650 mg/ml의 암모늄 설페이트 용액을 첨가하고 30 분 동안 200 rpm에서 교반시켜 효소 분자를 침적시켰다. 25 %의 GA (글루타르알데히드, Sigma, USA) 용액을 첨가하고 상온에서 30 분 동안, 이어서 4 °C에서 하룻밤 동안 교반(100 rpm)하여 효소들 사이의 가교결합을 유도하였다. 마지막으로, 가교결합된 효소층을 100 mM 트리스(Tris) 완충액(pH 7.4)으로 처리하여 미반응 카르복실기를 보호하고, 100 mM 인산 완충액(pH 7.0)으로 세척하였다. 효소가 고정화된 탄소나노튜브를 2 mg/ml의 농도로 100 mM 인산 완충액(pH 7.0)에 재현탁시켰다. 대조군 샘플은 상기 효소 침적 및 가교결합 단계 중에서 암모늄 설페이트 및 GA 용액 대신 완충 용액을 첨가하여 제조하였다.

[0061] 시험예 : 활성 및 안정성 측정

[0062] 탄소나노튜브에 고정화된 포도당 산화효소 : 먼저, 555 mM β -D-포도당 용액 : 0.21 mM o-디아니시딘 (3,3'-디메톡시벤지딘, Sigma, USA) 용액을 1 : 4.8 부피비로 혼합하여 반응 완충액을 제조하였다. 이어서, 100 mM의 인산 완충액 (pH 7.0) 중 3.79 mg/ml의 서양고추냉이 과산화효소 용액 10 μ l 및 0.05 mg/ml의 포도당 산화효소 / 탄소나노튜브 용액 10 μ l를 큐벳 중의 상기 반응 완충액 980 μ l에 첨가하였다. 500 nm에서의 흡광도 변화를 자외선-가시광선 분광광도계 (Shimadzu UV-1800PC, Japan)로 측정하였다. 효소 활성은 시간 의존적인 흡광도 변화의 경사에 의해 계산되었다. 포도당 산화효소 / 탄소나노튜브 용액은 상온에서 배양되었으며, 포도당/탄소나노튜브의 잔여 활성이 포도당 산화효소 / 탄소나노튜브의 안정성 조사를 위해 측정되었다.

[0063] 탄소나노튜브에 고정화된 인버타아제 : 먼저, 555 mM 수크로스 용액 : 0.21 mM o-디아니시딘 용액을 1 : 4.8 부피비로 혼합하여 반응 완충액을 제조하였다. 이어서, 0.5 mg/ml의 희석된 인버타아제 / 탄소나노튜브 용액 10 μ l를 상기 반응 완충액 970 μ l에 첨가하고, 상기 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 배양하여, 수크로스를 프럭토스 및 포도당으로 가수분해하였다. 3.79 mg/ml의 서양고추냉이 과산화효소 용액 10 μ l 및 4.0 mg/ml 포도당 산화효소 용액을 100 mM의 인산 완충액 (pH 7.0)에 첨가한 후, 포도당 산화효소 / 탄소나노튜브의 경우와 같은 방식으로 흡광도 변화를 측정하였다. 인버타아제 / 탄소나노튜브 용액을 30 $^{\circ}$ C에서 배양하고 잔여 활성을 시간 의존적으로 체크함으로써 인버타아제 / 탄소나노튜브의 안정성을 조사하였다.

[0064] 탄소나노튜브에 고정화된 서양고추냉이 과산화효소 : 7.14 mM의 ABTS (2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술포닉 에시드, Sigma, USA)를 100 mM의 인산 용액 (pH 7.0)에 용해시킴으로써 반응 완충액을 제조하였다. 이어서, 0.5 mg/ml의 서양고추냉이 과산화효소 / 탄소나노튜브 용액 50 μ l 및 30 중량%의 과산화수소 용액 20 μ l를 상기 반응 완충액 930 μ l에 첨가하였다. 405 nm에서의 흡광도 변화를 자외선-가시광선 분광광도계로 측정하고, 효소 활성은 시간 의존적인 흡광도 변화의 경사에 기초하여 계산되었다. 서양고추냉이 과산화효소 / 탄소나노튜브 용액을 65 $^{\circ}$ C에서 배양하고 잔여 활성을 시간 의존적으로 측정함으로써 서양고추냉이 과산화효소의 안정성을 체크하였다.

[0065] 공유결합 단계의 효소와 침적 및 가교결합된 효소의 잔여 활성을 시간에 따라 측정함으로써 안정성을 체크하였다 (도 11 내지 13). 도 11 내지 13에서 확인할 수 있는 바와 같이, 침적-가교결합된 효소 (EPC)가 공유결합 단계의 효소 (CA)보다 더 안정적이었는데, 이는 효소의 여러 지점에서 공유결합이 이루어져 효소의 변성과 유출을 효과적으로 예방하였기 때문이다. 공유결합 단계의 포도당 산화효소 (CA) 및 침적-가교결합된 포도당 산화효소 (EPC)의 활성은 각각 0.007 및 0.544 A500/분이었고, 공유결합 단계의 서양고추냉이 과산화효소 (CA) 및 침적-가교결합된 서양고추냉이 과산화효소 (EPC)의 활성은 각각 0.065 및 0.367 A500/분이었다. 이러한 결과는 포도당 산화효소 및 서양고추냉이 과산화효소 각각에서 공유결합 단계의 효소 (CA)보다 침적-가교결합된 효소 (EPC)가 각각 78 배 및 5.6 배 높은 효소 활성을 나타내는 것이다. 침적 및 가교결합 단계에서 효소의 탈제가 개선되어 활성이 높아질수록 민감한 효소 논리게이트 개발에 유리하다.

[0066] 실시예 1 : AND 논리게이트

[0067] 효소 논리게이트에서 침적-가교결합된 효소 (EPC)의 효용을 확인하기 위해, 완충 수용액에 침적-가교결합된 포도당 산화효소 복합체 및 침적-가교결합된 서양고추냉이 과산화효소 복합체를 혼합하여 AND 논리게이트를 구성하고, 입력으로서 포도당과 ABTS를 사용하였다 (도 2). 구체적으로, 침적-가교결합된 포도당 산화효소 복합체 10 μ l 및 침적-가교결합된 서양고추냉이 과산화효소 복합체 20 μ l를 큐벳 중의 100 mM 인산 완충액 (pH 7.0) 900 μ l에 혼합하였다. 이어서, 완충액, 1 M의 포도당, 1 mM의 ABTS, 그리고 1 M의 포도당 및 1 mM의 ABTS 둘 다를 각각 입력 (0,0), (1,0), (0,1), 그리고 (1,1)로서 첨가하였다. 405 nm에서의 흡광도 증가를 자외선-가시광선 분광광도계 (Shimadzu UV-1800PC, Japan)로 측정하였다. 포도당 산화효소가 촉매한 포도당의 산화에 의해 과산화수소가 발생하고, 이 과산화수소를 이용하여 ABTS가 서양고추냉이 과산화효소의 촉매 작용으로 인해 산화되면서 상기 흡광도가 증가하는 성질을 이용한 것이다. 405 nm에서의 흡광도가 0.3 이상이면 ON 출력신호 (출력 1)로 간주되고, 0.3 미만이면 OFF 출력신호 (출력 0)로 간주되었다. 입력 (0,0)으로서 포도당도 ABTS도 첨가되지 않는 경우, 405 nm에서의 흡광도 변화는 무시할만한 수준을 나타내어 시스템은 OFF (출력 0) 상태였다. 입력 (1,0) 또는 (0,1)에 해당하는, 포도당 또는 ABTS 중 어느 하나만 첨가한 경우에도, 출력신호는 여전히 OFF (출력 0)였다. 그러나, 입력 (1,1)로서 포도당과 ABTS 둘 다 첨가한 경우, ABTS의 산화에 의해 405 nm에서의 흡광도는 확실한 증가를 나타내고 따라서 ON 출력신호 (출력 1)를 나타냈다 (도 2 및 3). 포도당과 ABTS 둘 다 존재하면, 포도당 산화효소에 의해 포도당은 과산화수소를 생성하고, 이 과산화수소는 서양고추냉이 과산화효소에 의해 ABTS의 산화에 이용되는 것이다. 도 4는 각각의 2 항 입력신

호에 대한 흡광도 데이터의 반응 출력을 나타내는 막대그래프이다.

[0068] 실시예 2 : OR 논리게이트

[0069] 서양고추냉이 과산화효소 및 o-디아니시딘을 함유한 완충 수용액에 침적-가교결합된 포도당 산화효소 복합체 및 침적-가교결합된 인버타아제 복합체를 혼합하여 OR 논리게이트를 구성하고, 입력으로서 포도당과 수크로스 조합을 사용하였다 (도 5). 구체적으로, 침적-가교결합된 포도당 산화효소 복합체 10 μ l 및 침적-가교결합된 인버타아제 복합체 50 μ l를 큐벳 중의 o-디아니시딘 및 과산화효소(peroxidase) 용액 840 μ l에 혼합하였다. OR 논리게이트는 100 μ l의 완충액, 1 M의 포도당, 2 M의 수크로스, 그리고 1 M의 포도당 및 2 M의 수크로스 둘 다를 각각 입력 (0,0), (1,0), (0,1), 그리고 (1,1)로서 첨가함으로써 작동하였다. 37 °C에서 30 분 동안 배양한 후, 500 nm에서의 흡광도 증가를 자외선-가시광선 분광광도계 (Shimadzu UV-1800PC, Japan)로 측정하였다. 흡광도 증가가 0.3 미만이면 출력신호를 0으로 정의하고, 0.3 이상이면 ON을 나타내는 1로 정의하였다. 과산화수소를 필요로 하고 서양고추냉이 과산화효소가 촉매하는 o-디아니시딘의 산화로부터 흡광도 증가가 0.3 이상일 때 ON 출력신호가 발생된다. 과산화수소의 생성은 입력 분자 즉 포도당 또는 수크로스 중 어느 하나를 첨가함으로써 개시되었다. 입력 (1,0) 또는 (0,1)로서 포도당 또는 수크로스 중 어느 하나를 첨가한 경우, 500 nm에서의 흡광도는 증가하여 ON 출력신호 (출력 1)를 나타냈다. 과산화수소는 침적-가교결합된 포도당 산화효소가 촉매하는 포도당의 산화에 의해 생성된다. 수크로스는 침적-가교결합된 인버타아제의 촉매작용으로 포도당과 프럭토스로 가수분해되고, 생성된 포도당은 침적-가교결합된 포도당 산화효소에 의해 추가로 산화되어 과산화수소를 생성한다. 입력 (1,1)로서 두 분자 모두 첨가한 경우, 500 nm에서의 흡광도는 확실한 증가를 나타내고 따라서 ON 출력신호 (출력 1)를 나타냈다. 포도당도 수크로스도 첨가되지 않는 경우에만, 500 nm에서의 흡광도 변화가 0.3 미만이었으며 OFF 출력신호 (출력 0)를 나타냈다 (도 6 및 7).

[0070] 실시예 3 : 전기화학적 효소 논리게이트

[0071] 전기화학적 출력신호에 기초한 효소 논리게이트의 개발을 위해 효소 전극을 제조하였다. 침적-가교결합된 포도당 산화효소 복합체 7.5 μ l 및 침적-가교결합된 인버타아제 12.5 μ l를 Nafion® 용액 2 μ l와 혼합하여, Nafion®의 최종 농도가 0.5 중량%가 되도록 하였다. 이어서, 상기 혼합물 20 μ l를 유리 탄소전극 (GCE) (CH Instruments Inc., USA)에 캐스팅하고, 상온에서 1 시간 동안 건조시켰다. 상기 효소 전극은 사용할 때까지 4 °C의 100 mM 인산 완충액에서 보관하였다. 논리게이트의 전기화학적 측정은 효소 작동전극, Ag/AgCl 기준 전극, 및 백금 와이어 상대전극으로 구성된 3 전극 시스템을 사용하여 수행하였다. 상기 전극은 매개체로서 0.5 mM 벤조퀴논을 포함한 100 mM 인산 완충액 (pH 7.0) 10 ml에 침지시켰다. 작동 포텐셜 0.6 V의 효소 작동전극 대 SP-150 (Bio-logic, France)를 사용한 Ag/AgCl에서, 10 μ l의 완충액, 1 M의 포도당, 2 M의 수크로스, 그리고 1 M의 포도당 및 2 M의 수크로스 둘 다를 각각 입력으로 주입하여 생성되는 환원 전류를 전류측정법으로 측정함으로써 OR 논리게이트의 전기화학적 신호를 측정하였다. 상기 신호는 또한 10 mV/s의 주사속도에서 순환 전압측정법으로도 측정되었다.

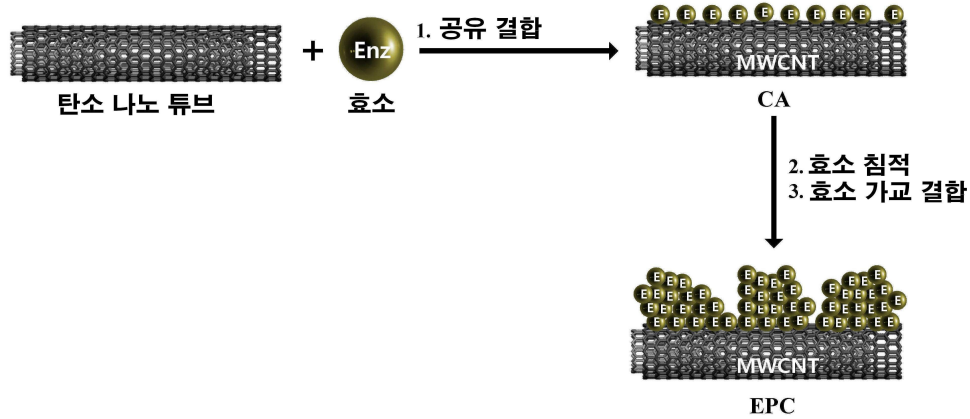
[0072] 탄소나노튜브와 산화효소를 함께 사용함으로써 효소 논리게이트 시스템으로부터의 출력신호를 전기화학적으로 측정할 수 있게 되었다. 효소 전극은 OR 논리게이트 제조에서처럼 유리 탄소전극 상에 Nafion®과 함께 침적-가교결합된 포도당 산화효소 복합체 및 침적-가교결합된 인버타아제를 고정화시켜 제조하였다. 포도당 및 수크로스가 입력으로서 첨가되고, 포도당 산화의 출력신호는 매개체로서 0.5 mM 벤조퀴논의 존재 하에서 포텐셜 0.6 V에서 전류측정되었다. 수크로스는 포도당과 프럭토스로 먼저 가수분해된 후에 생성된 포도당이 효소 전극에서 산화되므로, 포도당 주입에 비해 전류측정 반응이 느렸다 (도 8). (0,0), (1,0), (0,1), 및 (1,1)에 대응하는 입력신호의 각 조합에 대해 포텐셜 주사속도 10 mV/s에서 순환 전류전압곡선을 획득하였다 (도 9). (0,0)으로서 아무런 입력이 첨가되지 않은 경우, 순환 전류전압곡선에서는 무시할 만한 피크 전류가 검출되었으며, 따라서 출력신호는 0이었다. (1,0) 또는 (0,1)의 입력으로서 포도당 또는 수크로스 중 어느 하나가 첨가된 경우, 출력신호 ON (출력 1)의 피크 전류의 변화가 측정되었다. (1,1)의 입력으로서 포도당 및 수크로스 둘 다 첨가된 경우 또한 분명한 피크 전류 값의 변화를 보임으로서 출력 1이 나타났다. 각 실험은 5 회 반복되었으며, 출력신호의 평균이 오차막대와 함께 도 10에 표시되었다. 상기 도 10은 포도당이 0.25 V에서 산화하면서 전하를 내기 때문에 0.25 V에서의 값들의 차이를 알아보기 쉽게 막대그래프로 도시한 것이며, 각각의 입력신호에 대해서 출력신호를 내고 있음을 알 수 있다. 이를 통해서 효소를 탄소나노튜브에 고정화함으로써 논리게이트가 전기화학적으로 손쉽게 측정이 가능하다는 장점을 확인하였다.

[0073]

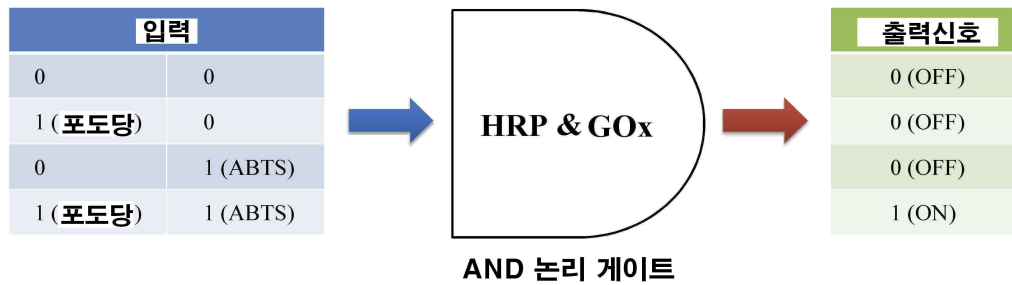
이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해서 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특징의 실시예에 한정되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 범위는 위의 실시예에 국한해서 해석되어서는 안되며, 후술하는 특허청구범위 뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 할 것이다.

도면

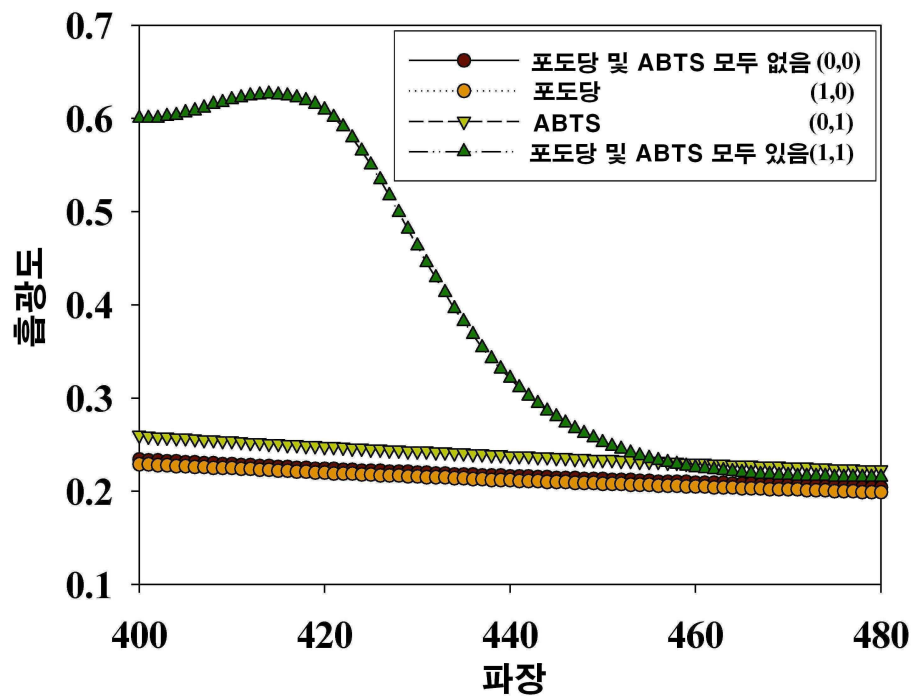
도면1



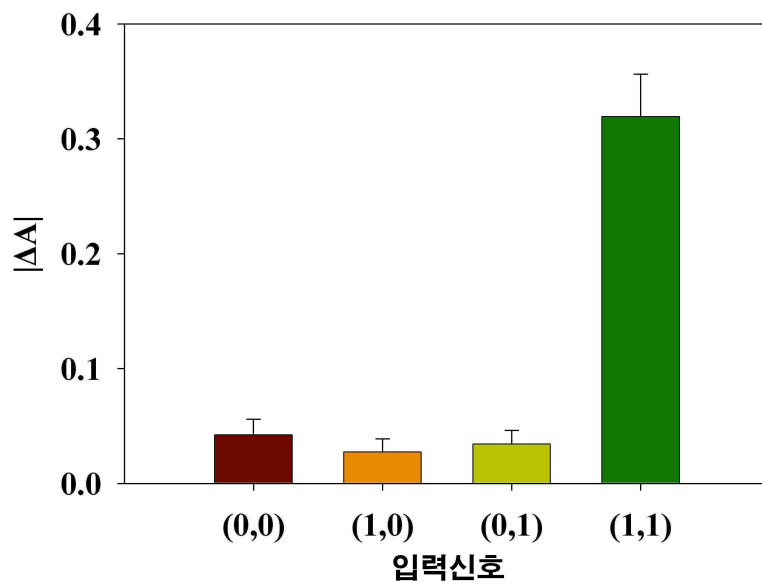
도면2



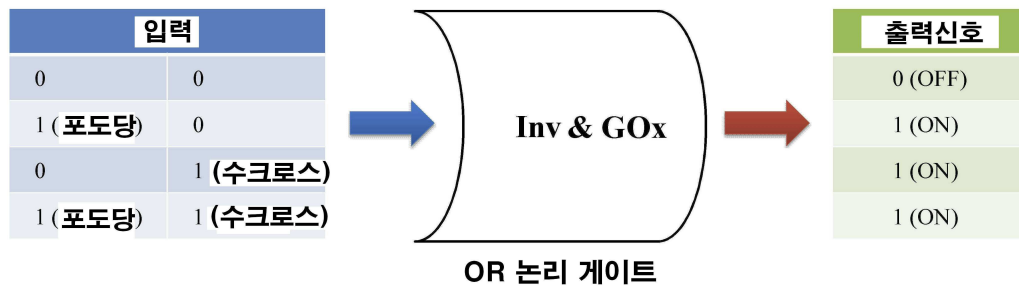
도면3



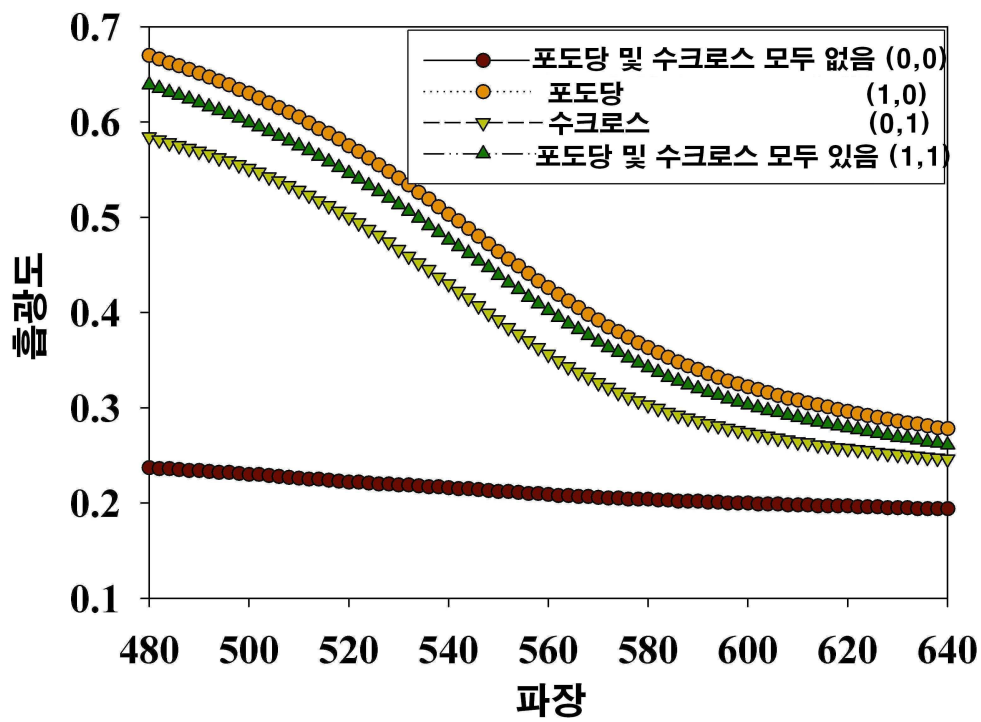
도면4



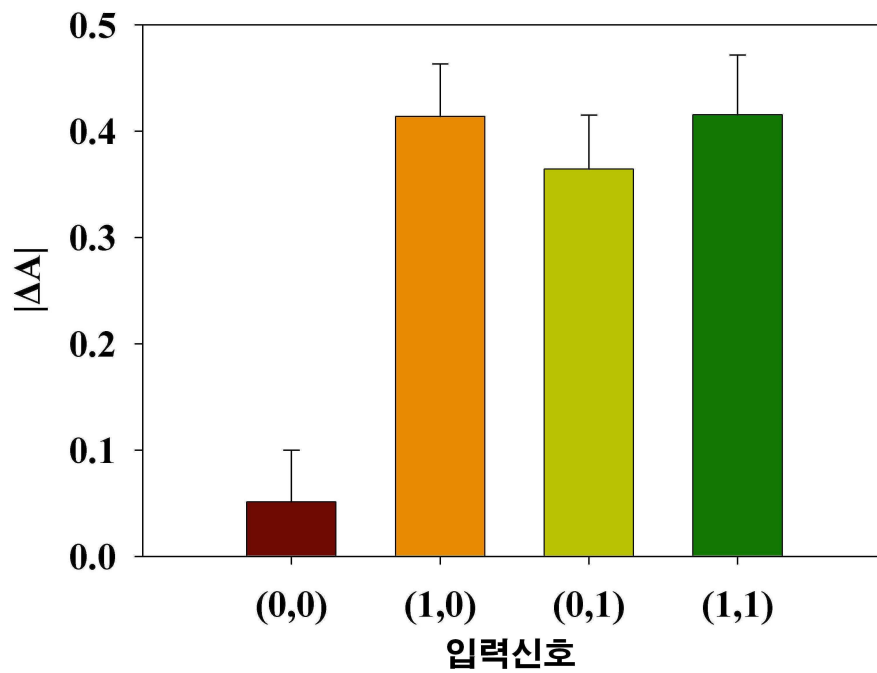
도면5



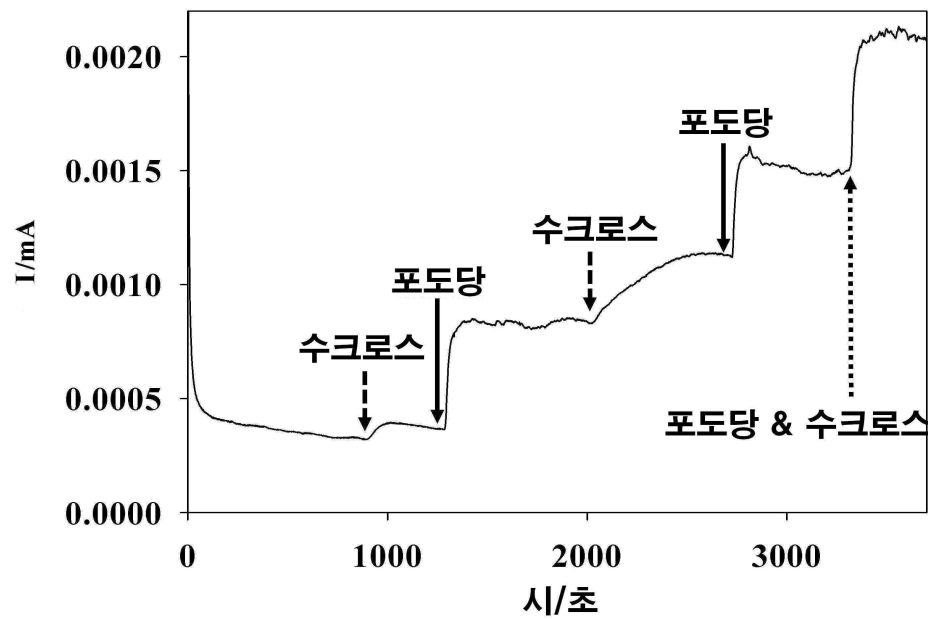
도면6



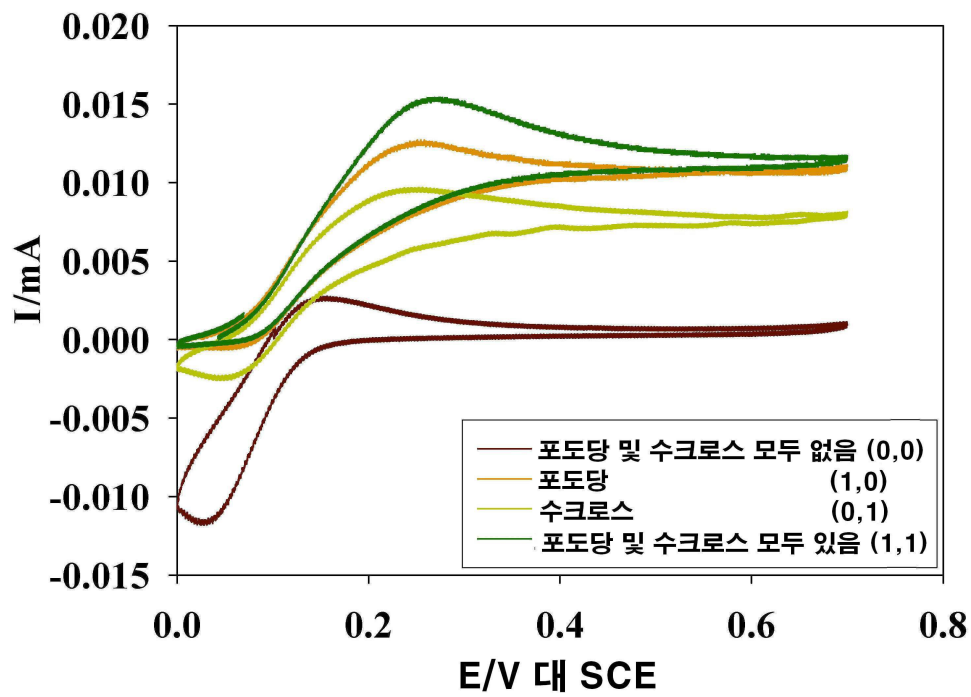
도면7



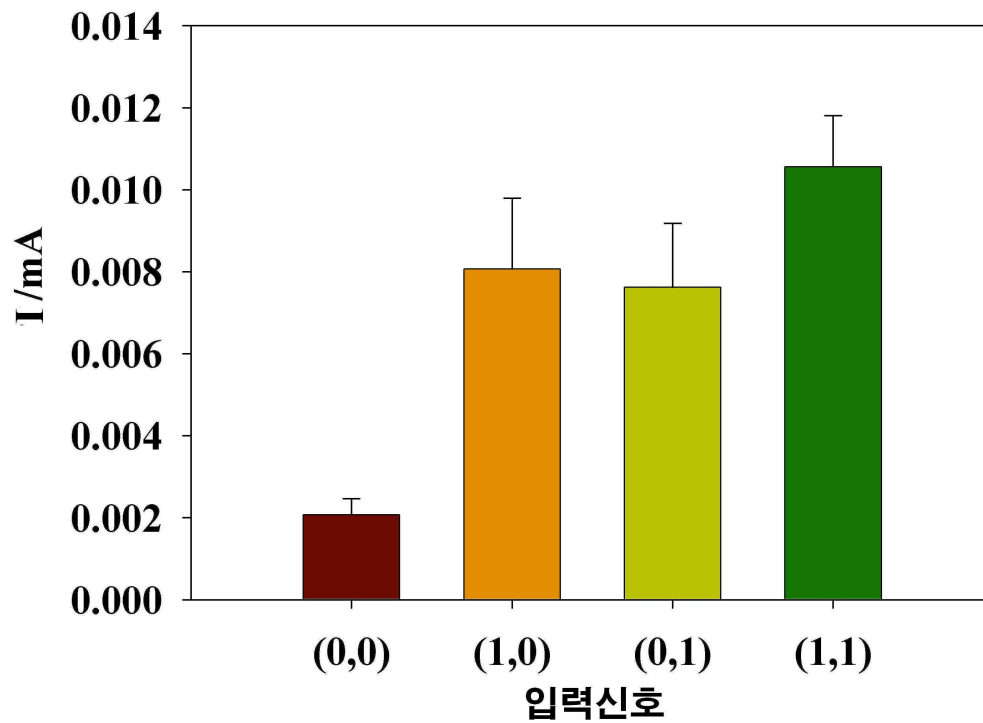
도면8



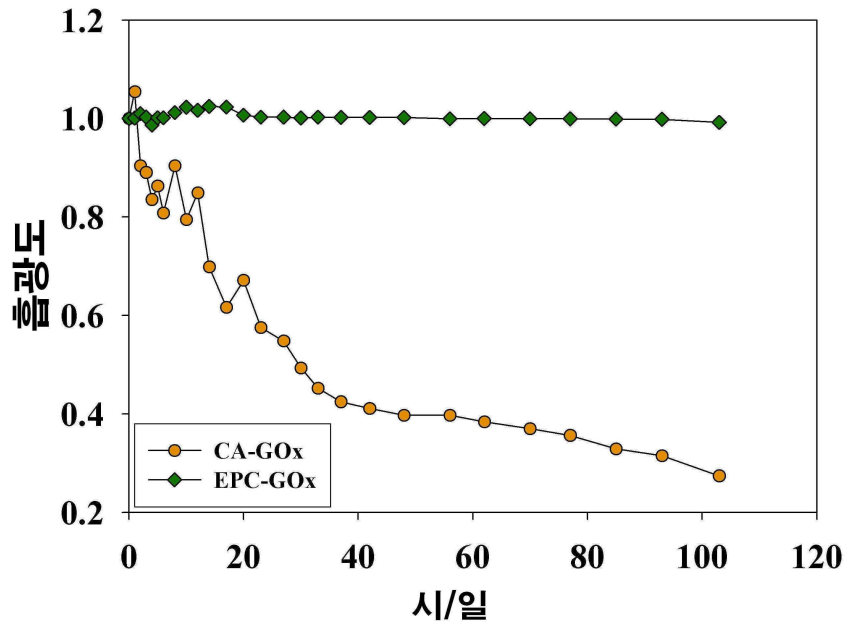
도면9



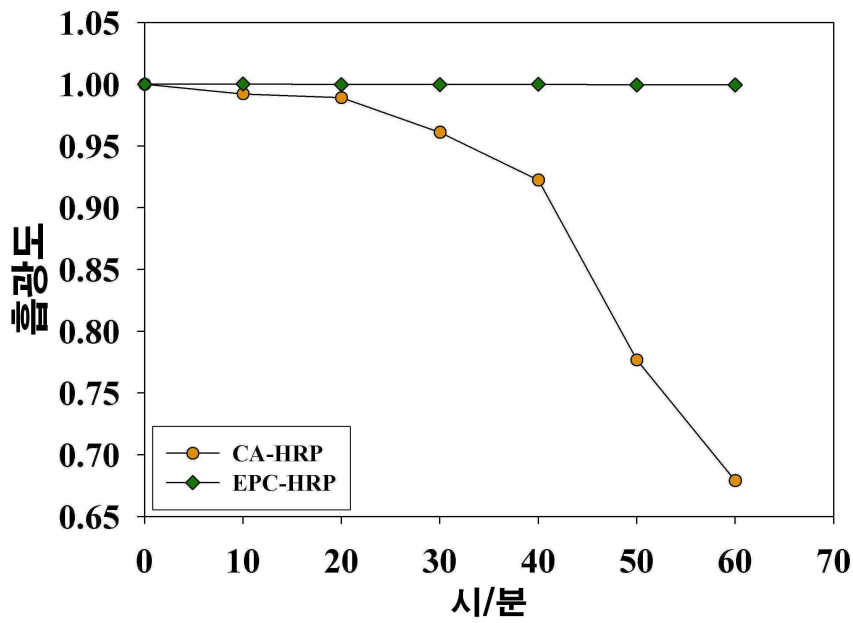
도면10



도면11



도면12



도면13

