



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0094553
(43) 공개일자 2020년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/36 (2006.01) G01N 3/20 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 1/36 (2013.01)
G01N 3/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0012183
(22) 출원일자 2019년01월30일
심사청구일자 2019년01월30일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
(72) 발명자
남기현
서울특별시 성북구 인촌로17가길 64, 106동 1404호(안암동1가, 래미안 안암)
조윤제
경상북도 포항시 남구 지곡로 155 (지곡동, 교수아파트) 9동 503호
(74) 대리인
이명진

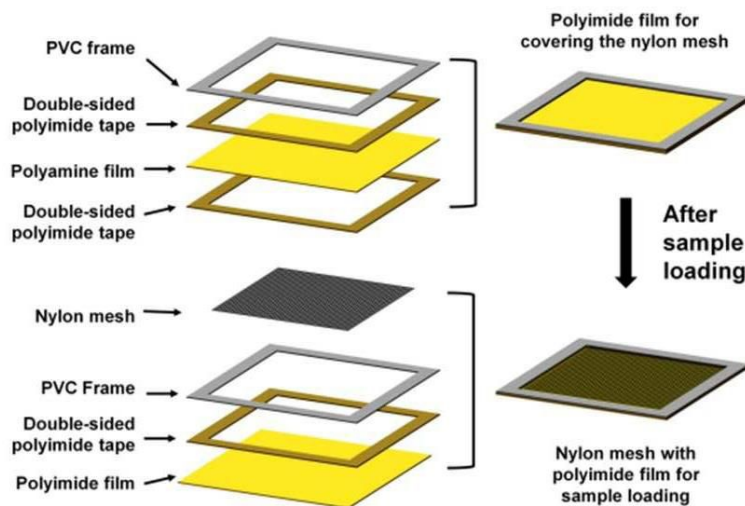
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 연속 결정학을 위한 메쉬 기반 결정 시료 홀더

(57) 요약

본 발명은 연속 결정학을 위한 결정 시료 장착용 시료 홀더 등에 관한 것으로, 본 발명의 시료 홀더는 기존의 시료 홀더와 비교시 제작 과정이 매우 단순하며 저비용으로 제작가능하며 X선 회절 데이터를 수집하는 동안 주변의 다른 장비에 물리적, 화학적 영향을 주지 않는다. 따라서, 빔라인을 안정적으로 운영할 수 있고, 빔타임 효율을 높힐 수 있으며 나아가, 점방식 스캔 (raster scan)이 가능하여 작은 크기의 칩에서도 많은 회절 이미지를 얻을 수 있다. 또한, 장시간 대기중에 보관하더라도 결정화 용액이 증발하는 문제가 발생하지 않으므로 기존에 보고된 시료 홀더에 비해서 전반적으로 사용이 용이하여 다양한 시료를 이용한 고정시료 연속 결정학 연구분야에 다양하게 응용될 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 35/00029 (2013.01)

G01N 2035/00138 (2013.01)

G01N 2223/056 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711064834

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)

연구과제명 XFEL 기반 고효율 결정 스캔 기술 및 선도 물질 검색 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 포항공과대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

제1시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀(frame)을 포함하는 제1필름커버;
결정 시료를 담지하고 고정하기 위한 메쉬 포어(mesh pore)가 형성된 메쉬 구조체; 및
제2시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀을 포함하는 제2필름커버를 포함하는, 연속 결정학(serial crystallography) 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 제1필름커버 및 제2필름커버에서 시료증발방지 필름 및 상기 필름을 둘러싸는 틀은 접착부재로 고정된 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 접착부재는 양면접착이 가능한 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 양면접착이 가능한 접착부재는 폴리이미드(polyimide) 테이프인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 메쉬 구조체는 상기 제1필름커버 및 제2필름커버 사이에 포함되는 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 제1필름커버의 틀은 제1시료증발방지 필름의 상부에 위치하고, 상기 메쉬 구조체는 제1필름커버의 틀 내부에 위치하는 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 시료 홀더의 소재는 X선에 투과되는 물질인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료

홀더.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 시료 홀더의 가로는 20 mm 내지 50 mm 이고, 세로는 20 mm 내지 50 mm 이며, 높이는 1 mm 내지 5 mm 인것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 메쉬 구조체의 소재는 나일론(Nylon), 폴리에스터(polyester), 폴리프로필렌(Polypropylene), 폴리에테르에테르케톤(Polyetheretherketone), 스테인리스 스틸(stainless steel), 및 에틸렌 테트라 플루오로 에틸렌(Ethylene-co-Tetra fluoro Ethylene)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 소재인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 메쉬 구조체에 형성된 메쉬 포어의 크기는 10 μ m 내지 200 μ m 인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 시료증발방지 필름의 소재는 폴리이미드(Polyimide), 폴리에틸렌테레프테라이트(polyethyleneterephthalate), 폴리에테르에테르케톤(Polyetheretherketone) 및 폴리(4,4'-옥시디페닐렌-피로멜리티미드)(poly(4,4'-oxydiphenylene-pyromellitimide))로 이루어진 군으로부터 선택된 1이상의 소재인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 결정 시료 장착용 시료 홀더.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 시료증발방지 필름의 두께는 100 nm 내지 30 μ m 인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 실험용 시료 홀더.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 틀의 소재는 PVC(Polyvinyl chloride), PET(polyethylene terephthalate), 폴리에스터(polyester), 및 바이닐(vinyl)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 소재인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 실험용 시료 홀더.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 틀의 깊이는 0.1 내지 0.5mm인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 실험용 시료 홀더.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 시료 홀더에 담지되는 결정 시료는 단백질 결정, 핵산 결정, 나노 결정 및 소분자 결정으로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 실험용 시료 홀더.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 시료 홀더는 XFEL(X-Ray Free-Electron Laser)을 이용한 FT-SFX(fixed-target serial femtosecond crystallography) 실험 또는 방사광 X선 (synchrotron X-ray)를 이용한 FT-SMX (fixed-target serial millisecond crystallography) 실험에 사용하기 위한 것을 특징으로 하는, 연속 결정학 실험용 시료 홀더.

청구항 17

하기 단계를 포함하는 연속 결정학(serial crystallography) 실험을 위한 시료 준비 방법:

- (a) 제1항의 상기 제1필름커버의 상단에 시료가 담지된 메쉬(mesh) 구조체가 위치하도록 준비하는 단계; 및
- (b) 제1항의 상기 제2필름커버의 제2시료증발방지 필름 및 상기 (a) 단계의 제1필름커버의 틀을 접착부재로 고정시켜 상기 (a) 단계의 메쉬 구조체를 밀봉 시키는 단계.

청구항 18

하기의 단계를 포함하는 제1항의 시료 홀더 제조방법:

- (a) 제1시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀(frame)을 포함하는 제1필름커버, 제2시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀을 포함하는 제2필름커버, 및 결정 시료를 담지하고 고정하기 위한 메쉬 포어(mesh pore)가 형성된 메쉬 구조체를 준비하는 단계; 및
- (b) 상기 (a)단계에서 메쉬 구조체를 상기 제1필름커버 및 제2필름커버 사이에 포함시키는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 연속 결정학을 위한 결정 시료 장착용 시료 홀더, 이의 제조방법 및 상기 시료 홀더를 이용한 연속 결정학 실험용 시료 준비 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] X선 결정학은 단백질, 핵산, 소분자등과 같은 결정 시료를 X선에 투과시켜 발생하는 회절 신호를 기반으로 고해상도 3차원 구조를 획득하는 실험 기법이다. 고해상도 결정 구조를 얻기 위해서는 방사광 가속기 (synchrotron) 또는 X선 자유전자 레이저 (X-ray free electron laser: XFEL)에서 제공되는 높은 휘도의 X선 광원을 사용한다. X선 회절 데이터를 수집하기 위해서는 가속기 빔라인의 X선이 지나가는 경로에 결정 이동 시키고 발생하는 회절 신호를 검출기로 기록한다.

[0003] 방사광 가속기에서는 일반적으로 결정 시료를 나일론 고리 (nylon loop), 유리 미세관 (glass capillary)등에 설치 (mounting) 한 뒤 빔라인에 설치되어 있는 측각기 (goniometer) 장치에 연결하여 X,Y 축으로 이동하여 결

정 시료를 X 선 집속 위치로 이동시킨다. 그리고 3차원 구조를 얻기 위해 데이터 수집 동안 측각기를 회전 시키며 X선 회절 데이터를 수집한다. 한편, 결정 시료가 작거나 거울장치를 통해 X선의 회도를 높게 집속한 경우, 결정 시료는 방사선에 의해 시료 손상이 발생할 수 있으며, 이는 결정 시료를 손상시켜 회절 강도가 낮춰 구조를 규명하기 위한 충분한 데이터 수집이 어렵게 할 수 있다. 상기 문제를 해결하기 위한 방법 중 다수의 결정 시료를 연속적으로 X선에 노출하여 회절 데이터를 수집하고, 다수의 결정으로부터 얻게 된 회절 이미지의 정보를 한 개로 합쳐 3차원 구조를 규명하는 방법이 기법이 존재하는데, 이를 연속 결정학 (serial crystallography)라고 한다. 즉, 연속 결정학은 기존 X선 결정학의 발전된 형태라 할 수 있다.

[0004] 3세대 방사광 가속기 마이크로 빔라인에서에서 나일론 고리 등에 작은 결정 시료를 놓고 저온 (100K)의 액체 질소 가스를 이용하여 시료를 고정하고 회절 데이터를 수집한 사례가 있으나, 저온에서의 결정 구조 정보는 실온에서 존재하는 단백질 구조와 생물학적 차이가 존재할 수 있으므로 실온에서 회절 데이터를 수집하는 것이 중요하다. 실온에서 데이터 수집 시 나일론 고리의 결정들이 중력방향으로 내려 앉아 균일하게 분포되지 않는 문제가 발생한다.

[0005] 한편, XFEL은 빛의 밝기가 기존 방사광에 비해 10-100억배 밝은 X선 광원으로 수십 펨토초의 펄스 폭 (pulse width)을 갖은 강력한 X선이다. XFEL의 펄스 폭은 X선에 의해 물질이 손상되는 시간보다 짧기 때문에 방사선 손상 없이 상온에서 분자의 결정 구조를 시각화 할 수 장점이 있다. 다만 높은 회도의 X선을 사용하기 때문에, 결정 시료는 XFEL이 투과한 후 시료 손상이 발생한다. 이러한 이유로 결정 시료를 연속적으로 X선 경로에 제공하고 다수의 결정 시료를 이용하여 3차원 구조 정보에 대한 회절 데이터를 수집하는데, 이러한 XFEL을 사용하는 연속 결정학 실험 기법을 연속 펨토초 결정학 (SFX: Serial femtosecond crystallography)라 한다. SFX에서 실온에서 결정 정보를 획득하기 때문에, 결정 시료를 X선 경로에 연속적으로 전달하기 위해서는 새로운 시료 배송 장치가 필요하다. 많은 수의 결정 시료를 지속적으로 전달하기 위해서 용액 젯 시료 인젝터 (liquid jet sample injector), 전기 방사 (electrospinning injector), LCP (lipidic cubic phase) 인젝터, 음향 인젝터 (Acoustic injector)등이 다양한 시료 배송법이 개발되었다. 그 중 고정 시료 연속 펨토초 결정학 (FT-SFX: fixed-target serial femtosecond crystallography)은 결정 시료를 특정 칩 위에 올려 놓고, 시료가 놓인 칩을 X,Y stage에 올려놓고 X선 경로에서 스캔하며 회절 데이터를 수집하는 방법으로 결정 시료 소비율을 획기적으로 낮출 수 있는 이점을 가지고 있다.

[0006] XFEL을 이용하는 FT-SFX 연구에서는 기존의 연구들은 대부분 실리콘 칩 (silicon chip)을 결정 시료를 고정하는 시료 홀더 (sample holder)로 사용하며 설계된 실리콘 칩에는 규칙적으로 일정 크기의 구멍 (hole)이 있으며 칩 구멍 내부는 표면 처리되어 안정적으로 결정이 장착될 수 있도록 가공 되어있다. 시료 홀더는 시료 챔버 (chamber)의 X, Y 스테이지 (stage)에 장착이 되고, 스테이지 제어를 통해 XFEL 펄스가 실리콘 칩의 각 구멍을 통과하게 실험을 설계하며 상기 구멍에 놓인 결정 시료는 낮은 수준의 배경 산란으로 회절 패턴을 생성하지만 실리콘 칩을 사용하는 FT-SFX 스캔에서 XFEL이 칩 구멍을 관통하지 않고 주변 실리콘 재료를 관통할 때 XFEL이 굴절되어 검출기에 물리적 손상을 발생할 수 있다. 이러한 이유로, 실리콘 칩의 구멍은 올바른 위치와 크기를 보장되도록 정밀 가공이 필요하며 또한, 실리콘 칩이 장착 될 스테이지의 홀더에서도 정확한 위치와 각도로 정렬하는 것이 중요하다. 결과적으로 실리콘 칩을 이용한 FT-SFX 연구는 준비과정에서 정밀한 칩 제조 및 장비 정렬 과정에서 많은 비용과 시간이 소비되며 실험을 하면서 매번 검출기 손상을 염려해야 한다. 한편, Mylar 필름 사이에 결정 시료의 놓고 회절 데이터를 수집하는 사례가 있는데, 이는 결정 시료가 중력방향으로 가라 앉는 문제가 발생하여 효율적인 데이터 수집이 어렵다.

[0007] 따라서, 기존 3세대 광원에서는 실온에서 회절 데이터를 수집하기 위해서 결정 시료가 균일하게 고정될 수 있어야 하며, XFEL을 이용한 FT-SFX에서는 실험 접근을 용이하기 위한 편리한 시료 고정 배송 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허공보 10-0967407

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 XFEL을 이용한 FT-SFX 실험에 이용되는 종래의 시료 홀더의 문제점을 해결하기 위해 예의 연구한 결과, X선이 굴절되지 않고 투과되면서, 데이터 분석에 영향이 없는 메쉬(mesh) 구조체를 이용한 시료 홀더를 완성하였다.
- [0010] 이에, 본 발명의 목적은 제1시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀(frame)을 포함하는 제1필름커버;
- [0011] 결정 시료를 담지하고 고정하기 위한 메쉬 포어(mesh pore)가 형성된 메쉬 구조체; 및
- [0012] 제2시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀을 포함하는 제2필름커버를 포함하는, 연속 결정학(serial crystallography) 결정 시료 장착용 시료 홀더를 제공하는 것이다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제1시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀(frame)을 포함하는 제1필름커버;
- [0015] 결정 시료를 담지하고 고정하기 위한 메쉬 포어(mesh pore)가 형성된 메쉬 구조체; 및
- [0016] 제2시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀을 포함하는 제2필름커버를 포함하는, 연속 결정학(serial crystallography) 결정 시료 장착용 시료 홀더를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 연속 결정학(serial crystallography) 실험을 위한 시료 준비 방법을 제공한다.
- [0018] (a) 상기 제1필름커버의 상단에 시료가 담지된 메쉬(mesh) 구조체가 위치하도록 준비하는 단계; 및
- [0019] (b) 상기 제2필름커버의 제2시료증발방지 필름 및 상기 (a) 단계의 제1필름커버의 틀을 접착부재로 고정시켜 상기 (a) 단계의 메쉬 구조체를 밀봉 시키는 단계.
- [0020] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 상기 시료 홀더 제조방법을 제공한다.
- [0021] (a) 제1시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀(frame)을 포함하는 제1필름커버, 제2시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀을 포함하는 제2필름커버, 및 결정 시료를 담지하고 고정하기 위한 메쉬 포어(mesh pore)가 형성된 메쉬 구조체를 준비하는 단계; 및
- [0022] (b) 상기 (a)단계에서 메쉬 구조체를 상기 제1필름커버 및 제2필름커버 사이에 포함시키는 단계.
- [0023] 본 발명의 일 구현예로, 상기 제1필름커버 및 제2필름커버에서 시료증발방지 필름 및 상기 필름을 둘러싸는 틀은 접착부재로 고정될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 접착부재는 양면접착이 가능한 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 양면접착이 가능한 접착부재는 폴리이미드(polyimide) 테이프일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 메쉬 구조체는 상기 제1필름커버 및 제2필름커버 사이에 포함될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 제1필름커버의 틀은 제1시료증발방지 필름의 상부에 위치하고, 상기 메쉬 구조체는 제1필름커버의 틀 내부에 위치할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 시료 홀더의 소재는 X선에 투과되는 물질일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 시료 홀더의 가로는 20 mm 내지 50 mm 이고, 세로는 20 mm 내지 50 mm 이며, 높이는 1 mm 내지 5 mm 일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 메쉬 구조체의 소재는 나일론(Nylon), 폴리에스터(polyester), 폴리프로필렌(Polypropylene), 폴리에테르에테르케톤(Polyetheretherketone), 스테인리스 스틸(stainless steel), 및 에틸렌 테트라 플루오로 에틸렌(Ethylene-co-Tetra fluoro Ethylene)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 소재일 수 있다.

- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 메쉬 구조체에 형성된 메쉬 포어의 크기는 10 μm 내지 200 μm 일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 시료증발방지 필름의 소재는 폴리이미드(Polyimide), 폴리에틸렌테레프테라이트(polyethyleneterephthalate), 폴리에테르에테르케톤(Polyetheretherketone) 및 폴리(4,4'-옥시디페닐렌-피로멜리티미드)(poly(4,4'-oxydiphenylene-pyromellitimide))로 이루어진 군으로부터 선택된 1이상의 소재일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 시료증발방지 필름의 두께는 100 nm 내지 30 μm 일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 틀의 소재는 PVC(Polyvinyl chloride), PET(polyethylene terephthalate), 폴리에스터(polyester), 및 바이닐(vinyl)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 소재일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 틀의 깊이는 0.1 mm 내지 0.5 mm일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 시료 홀더에 담지되는 결정 시료는 단백질 결정, 핵산 결정, 나노 결정 및 소분자 결정으로 이루어진 군에서 선택된 1이상일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 시료 홀더는 XFEL(X-Ray Free-Electron Laser)을 이용한 FT-SFX(fixed-target serial femtosecond crystallography) 실험 또는 방사광 X선 (synchrotron X-ray)을 이용한 FT-SMX(fixed-target serial millisecond crystallography) 실험에 사용하기 위한 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명의 시료 홀더는 기존의 시료 홀더와 비교시 제작 과정이 매우 단순하며 저비용으로 제작 가능하며, X선에 투과되는 물질을 사용하기 때문에 가속기 빔라인에서 X선 회절 데이터를 수집하는 동안 주변의 다른 장비에 물리적, 화학적 영향을 주지않는다. 따라서, 빔라인을 안정적으로 운영할 수 있고, 빔타임 효율을 높일 수 있으며 나아가, 메쉬에서 발생하는 산란은 회절 데이터 처리에 영향을 주지 않으므로 점방식 스캔 (raster scan)이 가능하여 작은 크기의 칩에서도 많은 회절 이미지를 얻을 수 있어 시료 챔버 내부의 공간 활용도를 높 일수 있다. 또한, 시료 홀더는 필름으로 밀폐되기 때문에 장시간 대기중에 보관하더라도 결정화 용액이 증발하는 문제가 발생하지 않는다. 또한 시료 홀더는 X,Y 스테이지를 포함하는 어떠한 장치에서 임의로 설치하여 회절 데이터를 수집할 수 있다. 결과적으로, 기존에 보고된 시료 홀더에 비해서 전반적으로 사용이 용이하므로 다양한 시료를 이용한 고정시료 연속 결정학 연구분야에 다양하게 응용될 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 나일론 메쉬(Nylon mesh) 기반 결정 시료 홀더의 구성을 간략히 나타낸 것이다.
- 도 2는 FT-SFX 실험에 사용된 본 발명의 나일론 메쉬의 구조를 나타낸 것이다.
- 도 3은 FT-SFX 실험에 사용한 나일론 메쉬 기반 결정 시료 홀더의 외형을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 시료 홀더를 이용해 결정 시료를 장착하는 방법을 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 시료 홀더에 결정 시료가 장착되어 밀봉된 상태를 나타낸 사진이다.
- 도 6은 본 발명의 시료 홀더에 X선이 침투한 후 폴리이미드(polyimide) 필름 외면에 형성된 구멍을 관찰한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 시료 홀더에 X선이 침투한 후 폴리이미드(polyimide) 필름 내부에 발생한 기포를 관찰한 것이다.
- 도 8a 및 8b는 본 발명의 시료 홀더를 이용해 규명한 전자 밀도 지도를 나타낸 것으로 도 8a는 리소자임(lysozyme)시료를 이용한 결과이고 도 8b는 글루코스 이소머라제(glucose isomerase)를 이용한 결과이다.
- 도 9는 본 발명인 시료 홀더의 X선 산란 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 발명자들은 XFEL을 이용한 FT-SFX 실험에 이용되는 종래의 시료 홀더의 문제점을 해결하기 위해 예의 연구한 결과, X선이 굴절되지 않고 투과되면서, 데이터 분석에 영향이 없는 메쉬(mesh) 구조체를 이용한 시료 홀더를 완성하였다.

- [0041] 구체적으로, 본 발명에서는 X선이 굴절되지 않고 투과되면서, 데이터 분석에 영향이 없는 낮은 산란 강도의 물질의 메시 구조체를 이용하였다. 상기 메시 구조체를 이용하는 경우 기존 시료 홀더와 비교시 제작 과정이 아주 단순하며 저비용으로 제작가능하고 상기 메시 구조체는 포어를 형성하고 있어 시료의 담지 및 고정 가능하다. 또한, X선에 투과되는 물질을 사용하기 때문에 가속기 빔라인에서 X선 회절 데이터를 수집하는 동안 주변의 다른 장비에 물리적, 화학적 영향을 주지 않으며, 메시에서 발생하는 산란은 회절 데이터 처리에 영향을 주지 않아 점방식 스캔(raster scan)이 가능하여 작은 크기의 칩에서도 많은 회절 이미지를 얻을 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명에서는 시료증발방지 필름을 이용하였다. 시료 홀더는 상기 필름으로 밀폐되기 때문에 장시간 대기중에 보관하더라도 결정화 용액이 증발하는 문제가 발생하지 않는다. 한편 기존 타 연구에서는 결정 용액의 증발로 결정 시료의 손상을 방지하기 위해서 습도 조절 장치를 사용 할 수도 있으나, 이 경우 결정 내에서 시료의 정렬에 대한 정보가 변경되는 문제점이 발생할 수 있다. 하지만 현재 개발 시료 홀더는 이러한 문제가 전혀 발생하지 않는다.
- [0043] 또한, 본 발명에서는 틀을 이용하였다. 상기 틀은 본 발명의 시료 홀더를 일정한 형태로 유지시켜 시료 홀더의 조작을 편리하게 하는 기능을 하며, 틀의 내부에 메시 구조체가 위치할 수 있어 실험 중 메시 구조체가 시료 홀더 내부에서 이동하는 것을 방지할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 시료 홀더 제조방법을 통해 메시 기반의 결정 시료 홀더 제작이 가능함을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [0045] 본 발명의 다른 실시예에서는, 본 발명의 시료 홀더에 시료 장착시 시료가 메시 구조체에 균일하게 분포되는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [0046] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명의 시료 홀더에 XFEL을 침투시킨 경우 폴리이미드 필름 표면에 구멍이 형성되고 폴리이미드 필름 내부에 기포가 발생하는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0047] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명의 시료 홀더에 리소자임 또는 글루코스 이소머라제를 장착하여 X선 회절데이터를 수집한 결과 전자 밀도 지도가 매우 명확하게 관찰됨을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 나일론 소재의 배경 산란을 분석한 결과 산란 강도가 데이터 처리에 영향을 주지 않은 낮은 수준임을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [0049] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0050] 본 발명은 제1시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀(frame)을 포함하는 제1필름커버;
- [0051] 결정 시료를 담지하고 고정하기 위한 메시 포어(mesh pore)가 형성된 메시 구조체; 및
- [0052] 제2시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀을 포함하는 제2필름커버를 포함하는, 연속 결정학(serial crystallography) 결정 시료 장착용 시료 홀더를 제공한다.
- [0053] 본 발명에서 상기 제1필름커버 및 제2필름커버에서 시료증발방지 필름 및 상기 필름을 둘러싸는 틀은 접착부재로 고정될 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 상기 접착부재는 양면접착이 가능한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서 상기 양면접착이 가능한 접착부재는 폴리이미드(polyimide) 테이프일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며 시료증발방지 필름 및 상기 필름을 둘러싸는 틀을 고정시킬 수 있으며 X선이 투과되는 물질이면 모두 포함될 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 상기 제1필름커버의 틀은 제1시료증발방지 필름의 상부에 위치하고, 상기 메시 구조체는 제1필름커버의 틀 내부에 위치할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며 시료 홀더의 밀봉에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 상기 메시 구조체의 일부는 틀 내부를 벗어나 위치할 수도 있다.
- [0057] 본 발명에서 상기 시료 홀더의 소재는 X선에 투과되는 물질일 수 있다. 이는 시료 홀더가 X선과 충돌시 굴절되어 검출기에 물리적 손상이 발생하는 것을 방지하기 위함이다.
- [0058] 본 발명에서 상기 시료 홀더의 가로는 20 mm 내지 50 mm 이고, 세로는 20 mm 내지 50 mm 이며, 높이는 1 mm 내지 5 mm 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니고 실험 대상 및 목적에 따라 변경 될 수 있다. 또한, 연속 결정학 실험을 수행하는데 지장을 주지 않는 한 상기 시료 홀더의 모양에 제한은 없으나 원형, 타원형, 부채꼴형,

또는 다각형일 수 있으며 바람직하게는 사각형일 수 있다.

- [0059] 본 발명에서 상기 메쉬 구조체의 소재는 나일론(Nylon), 폴리에스터(polyester), 폴리프로필렌(Polypropylene), 폴리에테르에테르케톤(Polyetheretherketone), 스테인리스 스틸(stainless steel), 및 에틸렌 테트라 플루오로 에틸렌(Ethylene-co-Tetra fluoro Ethylene)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 소재일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며 메쉬 구조를 형성하여 결정 시료의 담지가 가능하며 X 선을 투과시키는 소재이면 제한 없이 해당할 수 있다.
- [0060] 본 발명에서 상기 메쉬 구조체에 형성된 메쉬 포어의 크기는 10 μm 내지 200 μm 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며 실험에 이용되는 결정의 크기에 따라 제한없이 변경될 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 상기 메쉬 구조체의 20 mm 내지 40 mm 이고, 세로는 20 mm 내지 40 mm 이며, 높이는 1 mm 내지 3 mm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 실험 대상 및 목적에 따라 변경 될 수 있다. 또한, 연속 결정학 실험을 수행하는데 지장을 주지 않는 한 상기 메쉬 구조체의 모양에 제한은 없으나 원형, 타원형, 부채꼴형, 또는 다각형일 수 있으며 바람직하게는 시료 홀더의 모양과 같을 수 있다.
- [0062] 본 발명에서 상기 시료증발방지 필름의 소재는 폴리이미드(Polyimide), 폴리에틸렌테레프테라이트(polyethyleneterephthalate), 폴리에테르에테르케톤(Polyetheretherketone) 및 폴리(4,4'-옥시디페닐렌-피로멜리티미드)(poly(4,4'-oxydiphenylene-pyromellitimide))로 이루어진 군으로부터 선택된 1이상의 소재일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며 상기 필름으로 시료를 밀봉시 시료의 증발을 막을 수 있고 X 선을 투과시키는 소재이면 제한 없이 해당할 수 있다.
- [0063] 본 발명에서 상기 시료증발방지 필름의 두께는 100 nm 내지 30 μm 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 필름으로 시료를 밀봉시 시료의 증발을 막을 수 있고 X 선을 투과시킬 수 있는 범위의 두께이면 모두 포함 될 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 상기 시료증발방지 필름의 20 mm 내지 50 mm 이고, 세로는 20 mm 내지 50 mm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 시료 홀더, 틀 또는 메쉬 구조체의 크기에 따라 변경 될 수 있다. 또한, 연속 결정학 실험을 수행하는데 지장을 주지 않는 한 상기 시료증발방지 필름의 모양에 제한은 없으나 원형, 타원형, 부채꼴형, 또는 다각형일 수 있으며 바람직하게는 시료 홀더의 모양과 같을 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 상기 틀의 소재는 PVC(Polyvinyl chloride), PET(polyethylene terephthalate), 폴리에스터(polyester), 및 바이닐(vinyl)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 소재일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며 실험 수행에 있어서 시료 홀더의 형상을 일정하게 유지할 수 있을 정도의 경도를 가지고 있으면서 X 선을 투과시킬 수 있는 소재라면 모두 포함될 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 상기 틀의 깊이는 0.1 내지 0.5mm일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니고 메쉬 구조체의 높이에 따라 제한없이 변경될 수 있다.
- [0067] 본 발명에서 상기 틀의 20 mm 내지 50 mm 이고, 세로는 20 mm 내지 50 mm 이며, 폭은 1 mm 내지 5 mm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 시료 홀더, 시료방지 필름 또는 메쉬 구조체의 크기에 따라 변경 될 수 있다. 또한, 연속 결정학 실험을 수행하는데 지장을 주지 않는 한 상기 틀의 모양에 제한은 없으나 원형, 타원형, 부채꼴형, 또는 다각형일 수 있으며 바람직하게는 시료 홀더의 모양과 같을 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 상기 시료 홀더에 담지되는 결정 시료는 단백질 결정, 핵산 결정, 나노 결정 및 소분자 결정으로 이루어진 군에서 선택된 1이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, X 선 분석에 이용될 수 있는 시료는 모두 포함될 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 상기 시료 홀더는 XFEL(X-Ray Free-Electron Laser)을 이용한 FT-SFX(fixed-target serial femtosecond crystallography) 실험과 방사광 X선(synchrotron X-ray)를 이용한 FT-SMX(fixed-target serial millisecond crystallography)에 사용하기 위한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 연속 결정학(serial crystallography) 실험을 위한 시료 준비 방법을 제공한다.
- [0071] (a) 제1항의 상기 제1필름커버의 상단에 시료가 담지된 메쉬(mesh) 구조체가 위치하도록 준비하는 단계; 및
- [0072] (b) 제1항의 상기 제2필름커버의 제2시료증발방지 필름 및 상기 (a) 단계의 제1필름커버의 틀을 접착부재로 고정시켜 상기 (a) 단계의 메쉬 구조체를 밀봉 시키는 단계.

- [0073] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 제1항의 시료 홀더 제조방법을 제공한다.
- [0074] (a) 제1시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀(frame)을 포함하는 제1필름커버, 제2시료증발방지 필름을 둘러싸는 틀을 포함하는 제2필름커버, 및 결정 시료를 담지하고 고정하기 위한 메쉬 포어(mesh pore)가 형성된 메쉬 구조체를 준비하는 단계; 및
- [0075] (b) 상기 (a)단계에서 메쉬 구조체를 상기 제1필름커버 및 제2필름커버 사이에 포함시키는 단계.
- [0077] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0079] **[실시예]**
- [0080] **실시예 1. 메쉬(Mesh) 기반 시료 홀더 제작**
- [0081] 본 발명에서는 나일론 메쉬(nylon mesh)를 기반으로 시료 홀더를 제작하였으며, 결정화 용액의 증발을 방지하기 위해 폴리이미드 필름(polyimide film)을 사용하였다. 메쉬 기반 시료 홀더 제작은 도 1에 간략하게 소개되어 있으며, 상세 과정은 하기와 같다.
- [0083] 1) 나일론 기반 시료 홀더의 전체 크기는 30 mm x 30 mm 크기로 제작하였다.
- [0084] 2) 시료 홀더를 조작을 편하게 하기 위해 30 mm × 30mm 크기에 5 mm (폭) × 0.3 (두께)의 PVC 틀을 제작하였다.
- [0085] 3) 결정 용액의 증발을 방지하기 위해 30mm × 30mm의 크기 및 25 μm 두께의 폴리이미드 필름을 준비하였다.
- [0086] 4) 나일론 메쉬는 PVC 틀(frame)에 들어갈 수 있도록 20mm × 20mm 크기로 준비하였으며 메쉬 포어는 60 μm으로 하였다(도 2 참조).
- [0087] 5) 양면 폴리이미드 테이프를 이용하여 PCV 틀과 폴리이미드 필름을 접착하여 필름 커버를 제작하였다.
- [0088] 6) 제작된 필름커버의 PVC 틀 안쪽에 나일론 메쉬를 놓았다.
- [0090] 상기 과정을 통해 제작한 시료 홀더는 50 μm 간격으로 래스터 스캔을 수행 할 때 400 포인트를 수평 및 수직으로 스캔 가능하며 상기 설정은 단일 나일론 메쉬 칩에서 총 160,000 개의 회절 이미지를 수집하도록 설계한 것이다(도 3 참조).
- [0092] **실시예 2. 결정 시료 장착**
- [0093] 나일론 기반 시료 홀더에 시료 로딩을 하기와 같은 방법으로 수행하였다(도 4의 a 내지 d 참조).
- [0095] 1) 제1필름커버의 PVC 틀(frame)을 위로, 폴리이미드 필름이 아래로 향하도록 놓고 PVC 틀 안쪽에 나일론 메쉬를 놓았다.
- [0096] 2) 단백질 결정 용액 (80 μl)을 나일론 메쉬에 분주하였다.
- [0097] 3) 피펫을 이용하여 결정 용액이 고르게 퍼져 결정 시료가 메쉬의 홀에 균일하게 분배 되도록 하였다.
- [0098] 4) 결정 용액의 증발을 막기 위해 결정이 분주된 나일론 메쉬를 즉시 상부층의 폴리이미드 필름으로 덮었으며, 이때 양면 폴리이미드 테이프를 사용하여 상하부 폴리이미드 필름 사이를 밀봉했다.
- [0100] 상기의 과정을 리소자임 (30-40 μm) 또는 글루코스 이소머라제 (60 μm 미만)를 시료로 하여 수행한 하였으며

결정 크기를 고려하여 60 μm 메쉬 포어를 갖는 나일론 메쉬를 사용하여 결정 시료를 분포하한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 각 시료가 메쉬 구조체에 균일하게 분포된 것을 확인하였다.

[0102] 실시예 3. XFEL 침투 후 시료 홀더 관측

[0103] 상기 실시예 2의 방법으로 제조된 시료 홀더를 XFEL을 이용하여 데이터 수집 후 시료 홀더를 관찰한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 폴리이미드 필름의 표면에 구멍이 관찰되었으며, 이는 XFEL이 투과된 위치를 나타낸다. 데이터 수집 동안 모션 스테이지는 기계적으로 50 μm 간격으로 래스터 스캔을 하도록 설정되었으며 폴리이미드 필름의 XFEL을 통과하는 구멍 사이의 거리는 모션 스테이지와 소프트웨어에서 동일했다. 시료 위치에서 KB 미러(mirror)를 사용하여 집속한 빔 크기는 $4 \times 8 \mu\text{m}$ (FWHM)이었는데, XFEL 침투에 의해 생성된 폴리이미드의 표면 구멍 크기는 약 $6 \times 10 \mu\text{m}$ 이었다.

[0104] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이 XFEL이 통과한 위치에서 폴리이미드 막으로 둘러싸인 메쉬 구멍 내부에 공기가 형성된 것을 확인하였다. 이는 X선이 시료를 통과한 후에 생기는 방사선 손상에 의한 기체 거품으로 간주된다.

[0106] 실시예 4. 나일론 메쉬 기반 시료 홀더를 이용한 데이터 수집 및 구조 분석

[0107] XFEL이 시료 홀더를 통과할 때 주변 결정 시료가 물리적 변경에 노출되지 않도록 하기 위해 50 μm 간격으로 래스터 스캔을 수행하였다. 나일론 메쉬의 최대 가용 면적은 $20\text{mm} \times 20\text{mm}$ 이며 최대 160,000 개의 이미지를 수집할 수 있지만, 본 실시예에서는 PVC 틀로부터 멀리 떨어진 곳에 회절 데이터를 수집했다. 9.7 keV의 광자 에너지에 대해 20fs 펄스 폭의 30 Hz의 XFEL을 실험에 사용했으며 하기와 같이 리소자임(lysozyme)과 글루코스 이소머라제(glucose isomerase) 결정 시료를 이용하여 나일론 메쉬 기반 시료 홀더의 응용을 증명하였다.

[0109] 1) 리소자임 결정 시료

[0110] 결정 시료를 이용한 X선 회절 실험은 1개의 나일론 메쉬 시료 홀더를 이용하여 1 시간 14분 24초 동안 133,107 개의 이미지를 얻었다. 그 다음 Cheetah 프로그램을 사용하여 118,985개의 hit이미지 (Hit rate= 89.39%)를 얻었으며 검출기 기하학을 최적화 한 후 색인(indexing)된 이미지 80,177개 (Indexing rate=67.38%)를 얻었다. CrystFEL 프로그램의 partialator를 사용하여 post-refinement를 수행하였고, 최종적으로 1.65 Å의 회절 데이터를 수집했다.

[0111] 전체 신호 대 잡음비 (Signal/noise)와 완전성 (completeness)는 각각 6.61과 100%였으며, 전체 R_{split} 및 Pearson 상관효율(CC*)은 각각 10.28 및 99.62%였다. 최종 모델은 1.65Å 구조로 규명되었고 R_{work} 와 R_{free} 는 각각 19.93%와 22.75%였으며, 도 8a에 나타난 바와 같이 상기 실험을 통해서 얻게된 리소자임의 전자 밀도 지도(electron density map)는 C-말단을 제외한 Lys1에서 Leu129까지의 매우 명확하게 관찰되었다.

[0112] 2) 글루코스 이소머라제 결정 시료

[0113] 결정 시료를 이용한 X선 회절 실험은 1개의 나일론 메쉬 시료의 홀더를 이용하여 1 시간 14분 30초 동안 134,325개의 이미지를 얻었으며 데이터 처리는 앞선 리소자임 실험과 동일하게 적용하였다. 총 79,805 개의 hit 이미지 (Hit rate=59.41%)를 얻었으며, 36.53 %의 색인 속도로 29,157 개의 색인된 (indexing rate=36.53%) 이미지를 얻었다. 회절 데이터는 1.75 Å까지 사용되었다.

[0114] 전반적인 신호 대 잡음비 (Signal/noise ratio)와 완전성 (completeness)은 각각 4.03과 100%였고, 전체 R_{split} 및 CC*는 각각 21.63% 및 100% 이었다. 최종 모델은 1.75Å 데이터이며 R_{work} 와 R_{free} 는 각각 18.18%와 20.30%였으며 도 8b에 나타난 바와 같이 글루코스 이소머라제의 전자 밀도지도(electron density map)는 Tyr3에서 Gly388까지 매우 명확하게 관찰되었다.

[0115] 하기 표 1은 상기 실험의 데이터 수집 및 정제 통계이다.

표 1

[0116]

Data collection	Lysozyme	Glucose isomerase
Energy (eV)	9700	9700
Photons/pulse	$\sim 5 \times 10^{11}$	$\sim 5 \times 10^{11}$
Pulse width	20 fs	20 fs
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	1222
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	78.22, 78.22, 37.76	93.05, 99.00, 101.92
No. collected diffraction images	133107	134325
No. of hits	118985	79805
No. of indexed images	80177	29157
No. of unique reflections	29127	47861
Resolution (Å)	80.0-1.65 (1.71-1.65)	71.94-1.75 (1.81-1.75)
Completeness	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy	4660.8 (962.2)	356.8 (125.2)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	6.61 (1.36)	4.03 (1.45)
<i>R</i> _{split}	10.28 (78.73)	21.63 (64.71)
CC*	99.62 (73.90)	98.12 (94.15)
Wilson B factor (Å ²)	50.38	43.81
Refinement statistics		
Resolution (Å)	78.22-1.65	71.01- 1.75
<i>R</i> _{factor} / <i>R</i> _{free} (%)	19.93 / 22.75	18.18 / 20.30
B-factor (Averaged)		
Protein	43.40	40.06
Metal	41.55	30.96
Water	45.70	43.24
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.010	0.010
Bond angles (°)	1.071	1.078
Ramachandran plot (%)		
favored	98.43	96.9
allowed	1.57	2.8
outlier		0.3

[0119]

실시예 5. 나일론의 X선 산란분석

[0120]

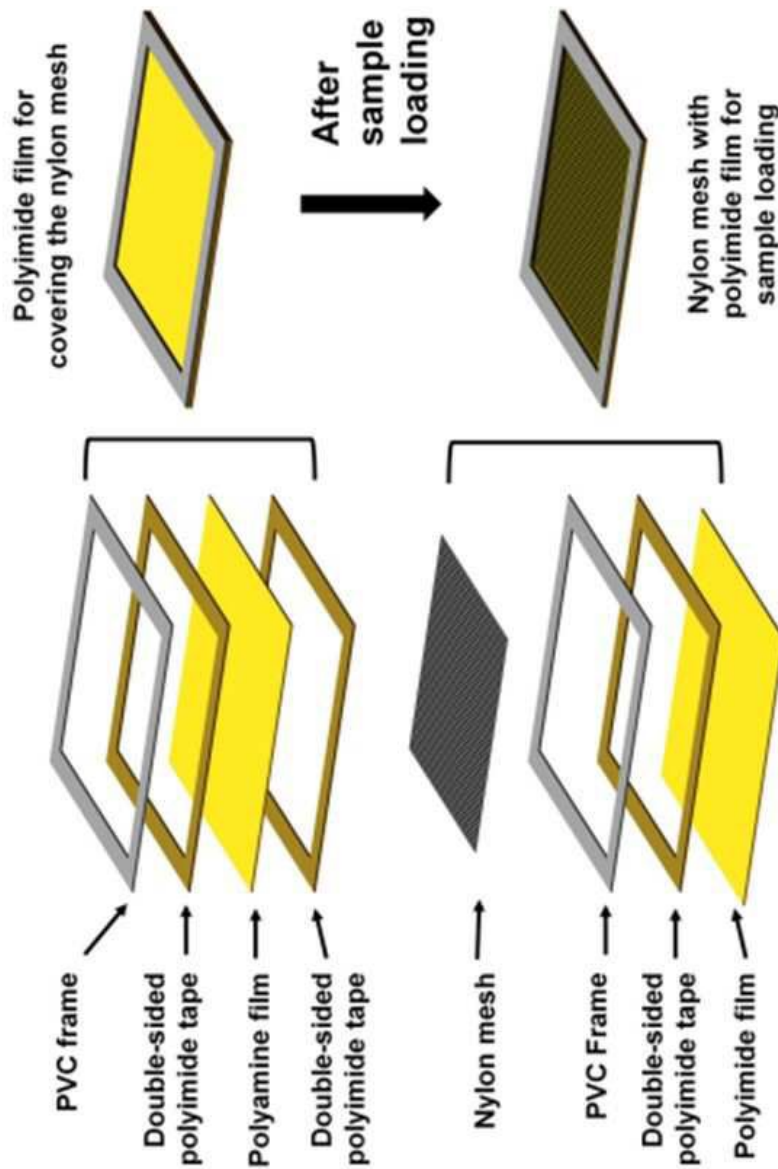
상기 실시예 4를 통해 폴리이미드 필름으로 둘러싸인 나일론 메쉬를 사용하여 결정 구조를 성공적으로 규명하였지만, 향후 효율적인 응용을 위해 나일론 소재의 배경 산란을 분석했다. 회절 이미지는 네 가지 이미지 패턴으로 분류했으며, 첫 번째 배경 산란 패턴은 빔 중심에 대해 양방향으로 3.75 및 4.30Å에서 관찰되었다 (도 9의 a참조). 상기 패턴은 일반적인 섬유가 X선에 노출 될 때 나타나는 X선 산란 경향과 동일하며 두 산란 점의 방향은 실제 나일론 섬유 축과 평행하다. 두 번째 패턴은 첫 번째 패턴의 90° 회전된 것으로 나일론 섬유의 방향이 90° 회전되었음을 나타낸다(도 9의 b참조). 세 번째 배경 산란 패턴은 빔 중심에 대해 4 개의 방향으로 관찰된다 (도 9의 c참조). 이것은 메쉬에 있는 나일론의 교차점을 가리킨다. 네 번째 패턴은 XFEL이 나일론 메쉬 홀을 통과하는 것으로 나일론의 산란이 없다 (도 9의 d참조). 4개의 회절 패턴에 대한 예상되는 나일론 투과 위치는 도 9의 e에 표시했다. 나일론은 3.75 Å과 4.30 Å에서의 산란을 나타내며 검출기에서 인식하는 강도는 약 600 AUD이었다(도 9의 f참조). 메쉬 기공을 통과하는 데이터와 비교하면 실제 나일론의 산란 강도는 약 200ADU에 해당하는데, 이는 데이터 처리에 영향을 주지 않는 낮은 수준의 산란 세기에 해당한다.

[0122]

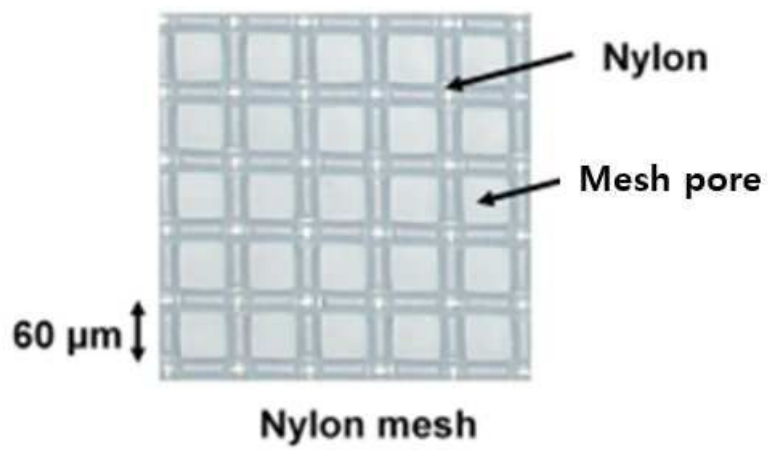
상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

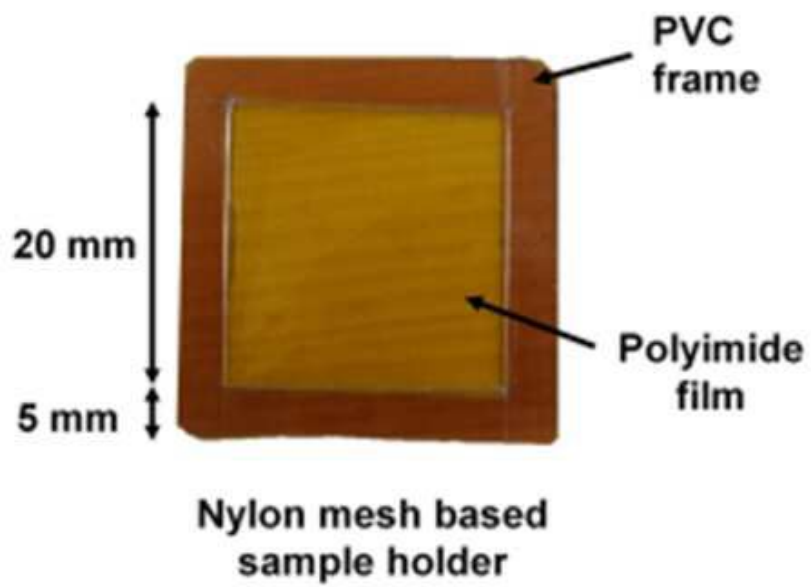
도면1



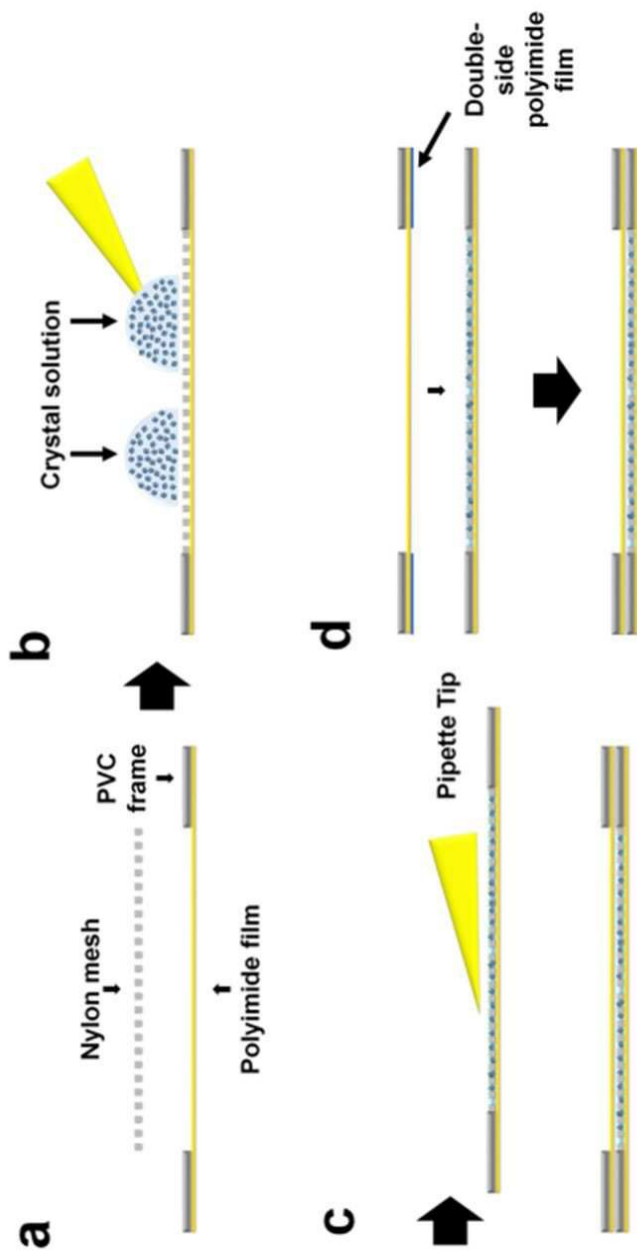
도면2



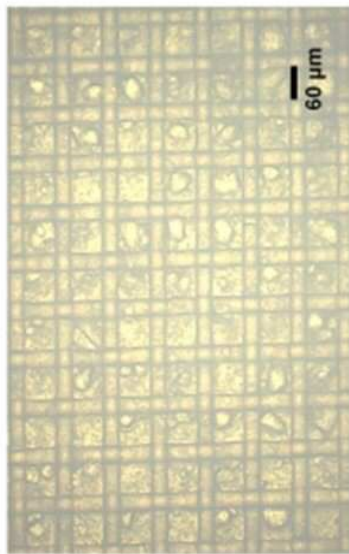
도면3



도면4



도면5

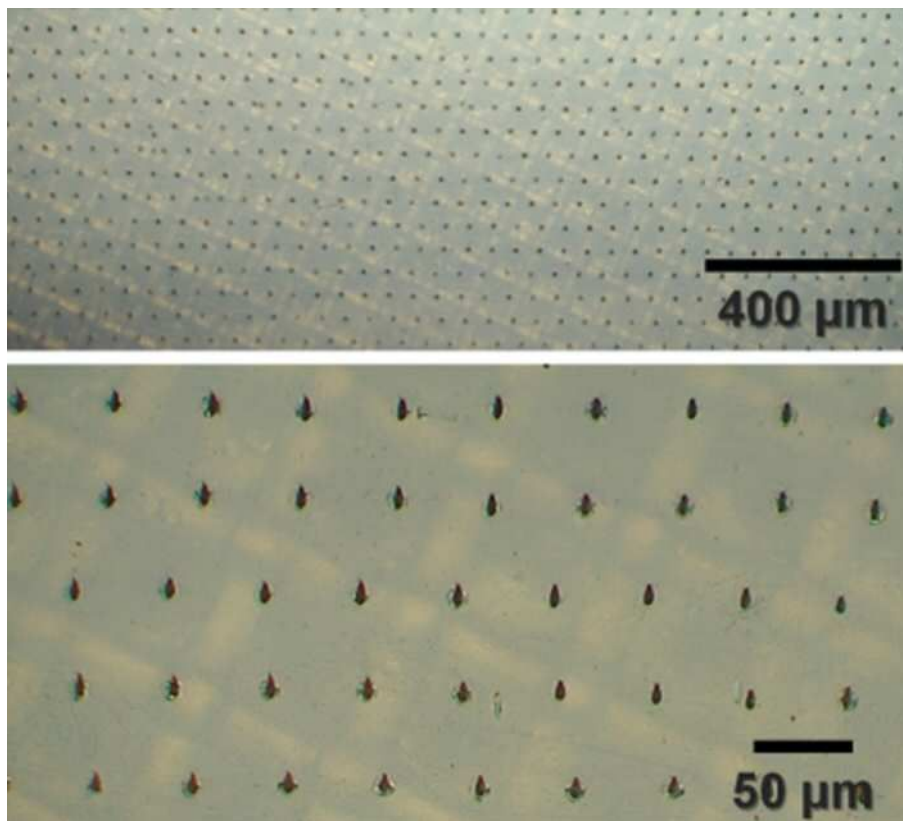


Glucose Isomerase

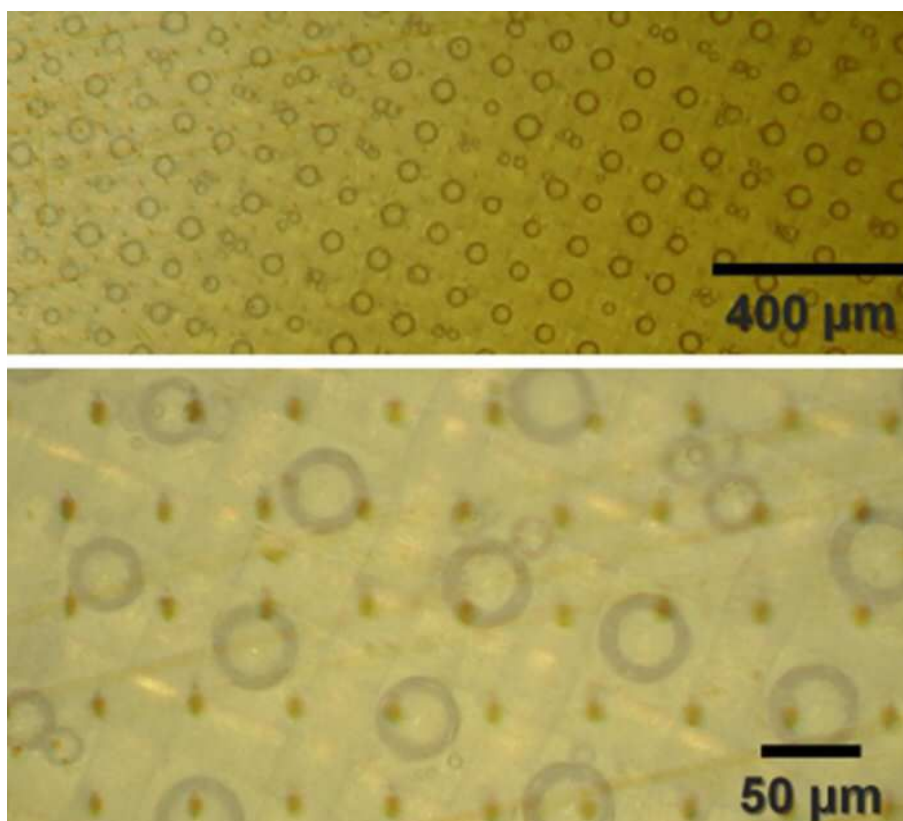


Lysozyme

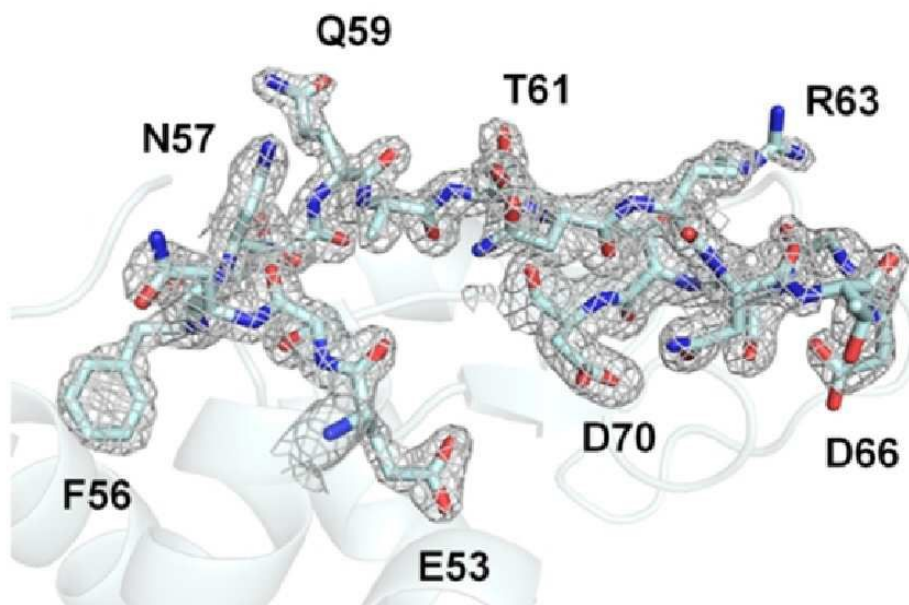
도면6



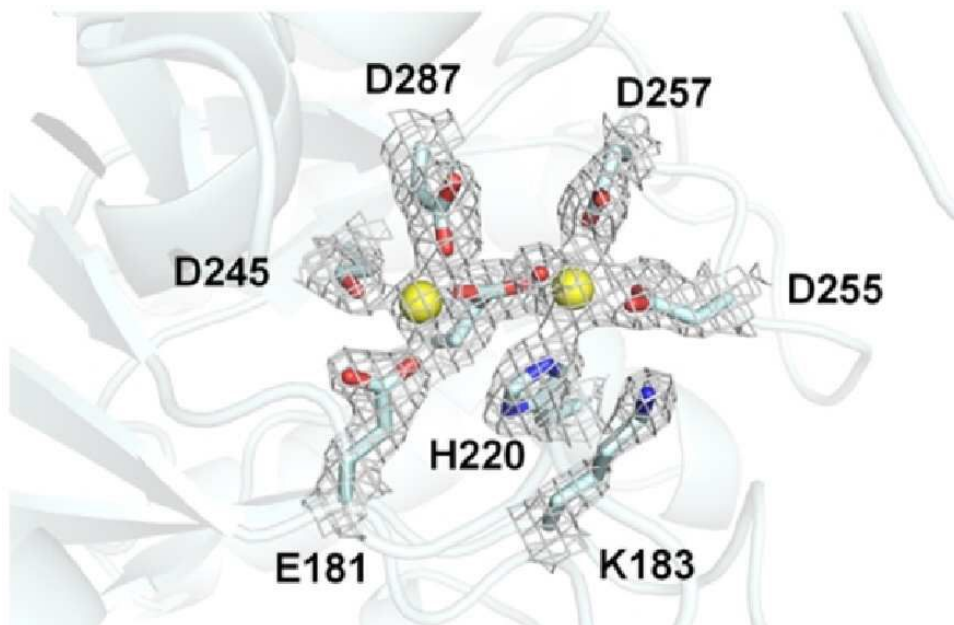
도면7



도면8a



도면8b



도면9

