

과제번호 2005-01321

바이오 전자사업

바이오전자소자용 단백질 설계 및 생산기술 개발

Development of protein production system and protein
design for bio-electrical device

한국생명공학연구원

교육과학기술부

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

이 보고서를 "생물분자로 구성된 바이오전자소자 기술 개발"과제(세부과제 "바이오전자소자용 단백질 설계 및 생산기술 개발")의 보고서로 제출합니다.

2011. 2. 25

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 정용원

연구원 : 정임식
" : 이창수
" : 김영은
" : 김주옥
" : 박경미
" : 박경숙
" : 이소연
" : 이인환
" : 이정민
" : 조현민

보고서 요약서

과제고유번호	2005-01321	해당 단계 연구 기간	2008.04.01 - 2011.03.31	단계 구분	2단계/총 3단계
연구사업명	중사업명	첨단의료기반기술개발사업			
	세부사업명	바이오 인터페이스 기술 개발사업			
연구과제명	대과제명	생물분자로 구성된 바이오전자소자 기술개발			
	세부과제명	바이오전자소자용 단백질 설계 및 생산기술 개발			
연구책임자	정용원	해당단계 참여 연구원수	총 : 32 명 내부 : 9 명 외부 : 23 명	해당단계 연구비	정부 : 689,000천원 기업 : 천원 계 : 689,000천원
		총연구기간 참여 연구원수	총 : 64명 내부 : 19명 외부 : 45명	총연구비	정부 : 1,419,000천원 기업 : 천원 계 : 1,419,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 바이오나노연구센터		참여기업명	해당사항없음	
국제공동연구	상대국명 : 해당사항없음		상대국연구기관명 : 해당사항없음		
위탁연구	연구기관명 : 해당사항없음		연구책임자 : 해당사항없음		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서면수	61
<p>차세대 정보저장 소자, 바이오나노 전자칩, Bio-FET 소자 등 나노바이오 전자소자용 생체분자 최적화 기술 및 이를 활용한 유비쿼터스형 바이오 전자소자 기술 개발</p> <p>생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계, 생산 및 바이오컨텐츠 뱅크 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 돌연변이 유발 세포주를 이용한 MBP의 in vivo 방향성 분자진화 기술 개발 및 라이브러리 구축과 이를 이용한 말토오스 유도 구조변화 기반 기능성 분자 스위치 단백질 개발 ◆ RNA구조 특이적 신규 RNA 결합 단백질 및 인터페이싱 링커 단백질컨텐츠 뱅크 구축 <p>생물전자소자용 단백질 고효율 발현 및 생산시스템 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 카스파제-3 단백질 분해효소 기반 DEVD/IETD 모티프를 이용한 one-step 다중생산 시스템 구현 ◆ One-step 다중생산 시스템 기반 3중 단백질 동시다발적 분리 [MBP, RFP, MBP-RFP] ◆ 대사 조절 대장균의 확보를 통한 단백질 고효율 발현 기술 구현 ◆ One-step biotin label된 단백질의 효율적 생산 시스템 구축 <p>생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 생체분자 고효율 표면 고정화를 위한 재설계 기술 개발 및 전자소자 표면 밀도개선을 위한 바이오 인터페이스 기술 개발 ◆ RNA 결합 프로브를 이용한 인터페이싱 마이크로 RNA 분석 기술 개발 ◆ 생체분자의 전기화학적 분석을 위한 생물전자소자 프로브 개발 <p>FET 센서 기반 생체분석 시스템 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ ISFET 센서를 이용한 큰카타머 MBP 및 의 핵소키나아제 구조변화 및 모니터링 ◆ 항체가 고정된 ISFET 바이오센서 개발을 통한 CRP 모니터링 기술 개발 ◆ 금속 표면을 포함하는 MOSFET 센서 시스템 개발 및 p53 단백질 및 변이 단백질의 FET 검출 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	단백질 설계, 단백질 정제, 단백질 공학, 바이오나노 소자, 분자 스위치, 생물전자소자 프로브, 나노바이오센서			
	영어	Protein design, Protein purification, Protein engineering, Bio-nano device, Biomolecular switch, Bio-electronic probe, Nano-bio sensor			

요 약 문

I. 제 목

바이오전자소자용 단백질 설계 및 생산기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

의생명과학 분야의 급속한 발전, 유비쿼터스 헬스케어에 대한 사회적 관심의 증대 등 시대의 흐름에 발 맞추어, 생체신호의 고감도 및 특이적 검출/분석 시스템 개발이 필요불가결 하며, 이를 위해 화학공학, 전자공학, 재료공학, 기계공학 등 공학분야 연구자와 의생명과학분야의 연구자가 유기적으로 연계할 수 있는 시스템, 즉 바이오전자소자와 같은 바이오인터페이스 영역의 연구가 절실히 요구됨. 특히, 바이오 메모리 소자, 분자 스위치, 단백질 프로세서칩 등은 BT, IT, NT가 융합되어 기술적인 시너지 효과를 극대화 시킬 미래기술의 핵심분야로 그 수요가 기하급수적으로 증가할 것으로 예측되며, 특히 **바이오 전자 소자용의 새로운 모델 단백질의 개발**의 필요성이 절실히 요구되고 있음. 따라서, 바이오 전자 소자용으로 이용 가치가 있는 소재 단백질들을 목적에 맞게 활용하기 위해서 유전공학 및 단백질 공학적 기술을 이용하여 특정 아마노산 첨가, 태그 융합, 단백질 구조변형, 리폴딩 등 그 단백질 특성에 맞는 재설계를 통해 유용한 형태의 단백질을 생산하는 것이 필요하며, 무엇보다도, 생체내 반응을 조절하는 단백질들은 극히 소량으로 존재하므로, 대장균 재조합 단백질 생산기술을 이용하여 안정성 및 활성이 높은 형태의 단백질 생산 기술 확립이 요구되며, 다양한 형태의 바이오 전자 소자용 단백질의 생산을 위해서 분자생물학적 기법을 기반으로 한 단백질 재설계를 통해 신기능 단백질을 개발하는 것이 가장 효율적인 방법이라 할 수 있음. 특히, 한국은 세계적으로 우수한 바이오 인력을 보유하고 있으며, 또한 정보 통신 기술 강국으로서, 이를 기반으로 하고 있는 바이오, 나노, 전자의 융합 기술 분야인 바이오 전자소자 기술은 차세대 미래 산업을 이끌어 갈 핵심 기술이라 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 **차세대 정보저장 소자, 바이오나노 전자칩, Bio-FET 소자 등 나노바이오 전자소자용 생체분자 최적화 기술 및 이를 활용한 유비쿼터스형 바이오 전자소자 기술을 개발** 하고자 함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계, 생산 및 바이오컨텐츠 뱅크 구축

- ◆ 돌연변이 유발 세포주를 이용한 MBP의 in vivo 방향성 분자진화 기술 개발 및 라이브러리 구축
- ◆ In vitro 방향성 분자진화 기법을 이용한 말토오스 유도 구조변화 기반 기능성 분자 스위치 단백질 개발
- ◆ RNA구조 특이적 단백질컨텐츠의 확보 및 신규 RNA 결합 단백질 뱅크 구축
- ◆ 인터페이싱 링커 단백질컨텐츠 확보

2. 생물전자소자용 단백질 고효율 발현 및 생산시스템 개발

- ◆ 카스파제-3 단백질 분해효소 기반 DEVD/IETD 모티프를 이용한 one-step 다중생산 시스템 구현
- ◆ One-step 다중생산 시스템 기반 3종 단백질 동시다발적 분리 [MBP, RFP, MBP-RFP]
- ◆ 대사 조절 대장균의 확보를 통한 단백질 고효율 발현 기술 구현
- ◆ One-step biotin label된 단백질의 효율적 생산 시스템 구축

3. 생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술 개발

- ◆ 생체분자 고효율 표면 고정화를 위한 재설계 기술 개발 [mutimer 페레독신, 형광단백질]
- ◆ 전자소자 표면 밀도개선을 위한 바이오 인터페이스 기술 개발 [글루코즈옥시다제 변이체-GOD6R]
- ◆ RNA 결합 프로브를 이용한 인터페이싱 마이크로 RNA 분석 기술 개발
- ◆ 생체분자의 전기화학적 분석을 위한 생물전자소자 프로브 개발

4. FET 센서 기반 생체분석 시스템 개발

- ◆ ISFET 센서를 이용한 콘카타머 MBP의 구조변화 모니터링
- ◆ ISFET 소자를 이용한 글루코오스 유도 헥소키나아제 구조변화의 ISFET 측정
- ◆ 항체가 고정된 ISFET 바이오센서 개발을 통한 CRP 모니터링 기술 개발
- ◆ 금속 표면을 포함하는 MOSFET센서 시스템 개발
- ◆ DNA 결합을 이용한 p53 단백질 및 변이 단백질의 검출

IV. 연구개발결과

1. 생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계, 생산 및 바이오컨텐츠 뱅크 구축

- ◆ In vitro 방향성 분자진화 기법을 돌연변이 유발 세포주를 이용하여 구축하였으며 Maltose binding protein (MBP) 단백질의 돌연변이 라이브러리를 구축함. 돌연변이 라이브러리를 이용하여 구조변화 기반 기능성 분자 스위치 단백질을 스크리닝 하였음.
- ◆ 유전자 재설계를 통하여 MBP의 구조변화 모니터링을 위하여 형광 단백질의 융합과 이를 이용한 FRET 센서를 개발하였음.
- ◆ 바이오전자소자용 바이오컨텐츠 발굴의 일환으로 특정 RNA구조에 특이적으로 결합할 수 있는 다양한 단백질 도메인을 (PAZ, dsRBD) 발굴 하였으며 또한 이들 도메인들을 이용하여 새로운 RNA binder를 재설계하였음.
- ◆ 자기결합 형광 단백질, 아비딘 변형체, 항체결합 단백질 변형체 등 5 종 이상의 인터페이싱 링커 단백질 뱅크를 구축하였음.

2. 생물전자소자용 단백질 고효율 발현 및 생산시스템 개발

- ◆ 카스파제-3 효소가 DEVD:IETD 모티프를 100%:50% 비율로 절단한다는 본 연구그룹의 결과를 기반으로 단백질 다중생산 시스템을 구현하였으며, MBP-RFP, MBP, RFP 3종 단백질을 성공적으로 분리함.
- ◆ One-step 다중생산 시스템 기반으로 3종 단백질 (MBP, RFP, MBP-RFP) 동시 다발적 분리하였음.
- ◆ 대장균 균주 내 단백질 생산 대사가 조절된 균주들을 확보하고 이들을 이용하여 발현이 어려운 형광 단백질 및 avidin 변형체들을 생산하였음.
- ◆ 단백질에 특이적인 부분에만 하나의 바이오틴을 중합시킬 수 있는 대장균 시스템을 이용하여 위의 PAZ 단백질 등 다양한 단백질에 특이적으로 바이오틴이 중합된 재조합 단백질들을 발현 확보하였음.

3. 생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술 개발

- ◆ 중합 도메인 삽입 기법을 사용하여 단량체, 이중합체, 삼중합체, 사중합체 4종의 페레독신 단백질 및 형광단백질을 개발하였으며, 이들의 전자소자표면 고효율 고정화를 확인하였음.
- ◆ 전자소자용 효소의 표면 밀도개선을 위해 알파-아밀레이즈 시그널 서열을 결합시킨 알기닌-글루코즈옥시다제 변이체 개발함
- ◆ 알파-아밀레이즈 시그널 서열을 결합시킨 알기닌-글루코즈옥시다제 변이체를 개발함
- ◆ 마이크로 RNA를 결합하는 단백질 혹은 LNA 프로브 개발을 통하여 생체분자의 전기화학적 분석을 위한 생물전자소자 프로브를 개발하였음.

4. FET 센서 기반 생체분석 시스템 개발

- ◆ ISFET 소자를 이용하여 말토오스-유도 콘카타머 MBP (MBP-MBP-His) 및 글루코오스 유도 헥소키나아제 구조변화를 모니터링하였으며, 단백질-단백질, 항체-항원 상호작용에 의해 전류 흐름의 변화를 측정할 수 있는 기능성 PDA를 개발하였음.
- ◆ n-type ISFET 바이오센서를 제작하였으며, 구현된 ISFET 바이오센서 상에서 항체 항원결합 반응을 이용하여 염증 등에 대표적인 마커인 C-reactive protein (CRP)을 검출 분석하였음
- ◆ 다른 FET 기반의 센서인 metal oxide semiconductor field effect transistor (MOSFET)를 제작하여 단백질과 DNA간의 결합을 분석 하고 이를 이용하여 변이 단백질의 모니터링 시스템을 개발하였음 (p53 단백질 및 변이 단백질의 검출)

V. 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구에서 개발된 생물전자소자용 생체분자 재설계 및 생산 시스템은 메모리 용 혹은 진단용 생물전자소자의 최적화에 활용될 것이며 특히 분자진화 기법을 이용한 기능성 단백질의 개발방법은 메모리저장 혹은 전자신호전달 기능을 가지는 생체분자의 제작을 가능하게 할 것 임. 더욱이 고효율 발현 생산 시스템의 확립은 상용화 단계에서 유용한 기술이 될 것임. 향후 이러한 바이오컨텐츠 बैं크를 활용한 바이오전자소자 센서 등의 개발을 위하여 센서 디바이스에 따른 혹은 전기신호 전달 방법에 맞춤형 생체분자 최적화 기술이 요구됨
- 알파-아밀레이즈 시그널 서열을 결합시킨 알기닌-글루코즈옥시다제 변이체는 전자소자용 효소의 표면 밀도개선을 가능하게 하여 보다 효율적인 전자신호전달을 보여줄것이며, 다중 도메인을 가지고 있는 페레독신 혹은 형광단백질을 이용하여 또한 배향성 및 표면 부착능이 향상된 생체분자로서 바이오전자소자로 활용될것임. 이러한 효소의 직접적 고정화 기능성의 부여뿐 아니라 본 연구에서는 또한 유니버설 링커 역할이 가능한 항체 고정화 단백질, Small 아비딘 링커 등을 개발하여 다양한 타겟 생체분자에 대한 표면 고정화 및 이들을 이용한 전자신호전달 최적화를 링커를 통하여 이룰 수 있게 하는 플랫폼을 제시하고 있음. 향후 바이오전자칩 혹은 나노와이어 등의 구조체에 적용하여 보다 다양한 바이오전자소자 분야에 응용이 가능할 것임.
- 또한 본 연구에서 개발된 마이크로 RNA를 결합하는 단백질 혹은 LNA 프로브는 항체 이외에 생체분자를 인식하는 새로운 프로브를 제시하고 있으며 이러한 프로브는 향후 바이오전자센서의 개발에 중요한 역할을 할 것임. 특히 본 연구 3단계 연구에서는 이러한 프로브의 최적화를 통하여 생체분자 인식 시그널을 전자시그널로 전환하는 기술을 최적화하여 바이오전자센서 시스템을 개발 할 것 임. 트랜지스터 기반의 FET센서의 개발을 통해 다양한 생체신호 분석기술을 개발하였으며 생체분자 구조변화, 결합변화, DNA/단백질 결합 등의 신호를 트랜지스터상에서 관찰하였음. 이러한 새로운 생체인식 프로브, 인터페이싱 기술, 또한 FET 센서 기술을 융합하여 새로운 바이오전자소자센서의 개발이 가능할 것 임.

S U M M A R Y

The aim of this project is to develop the protein engineering system for the use of bio-electric devices such as biomolecule memory device, lab-on-a-display, biomolecular switch, and bio-FET device and its applications for ubiquitous bio-electric molecule technology.

(1) Design and production of biomolecules for bio-electric device: we have engineered various recombinant proteins such as maltose-binding protein (MBP), RNA binding proteins (PAZ and dsRBDs), and bio-interfacing proteins (Rhizavidin). In this case, protein expression and purification conditions have been established.

(2) High yield protein production system for the use of bio-electric device: various newly designed protein conjugates were effectively produced. The proteins were Caspase-3 substrate DEVD:IETD conjugate, MBP-RFP fusion protein, and avidin variants.

(3) Ubiquitous bio-interfacing technology development for bio-electric device: several proteins (ferredoxin, GFP, and glucose oxidase) were engineered to have better ability to be immobilized onto bio-electric device surface. Structure specific RNA binding protein was fabricated from native RNA binding domains, PAZ and dsRBDs.

(4) FET sensor-based bio-analytical system: ISFET and MOSFET sensor systems were used to detect various biological signals such as structural changes in MBP proteins, CRP protein antigen-antibody interaction, and p53 interaction with its target DNA.

C O N T E N T S

Chapter 1. Significance and Aims of Study -----	11
Chapter 2. Background -----	12
Chapter 3. Results and Discussion -----	16
Chapter 4. Contributions -----	53
Chapter 5. Possible Applications -----	57
Chapter 6. Information Collected During the Study -----	58
Chapter 7. Reference -----	59

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	12
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	16
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	53
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	57
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	58
제 7 장 참고문헌 -----	59

제 1 장 연구개발과제의 개요

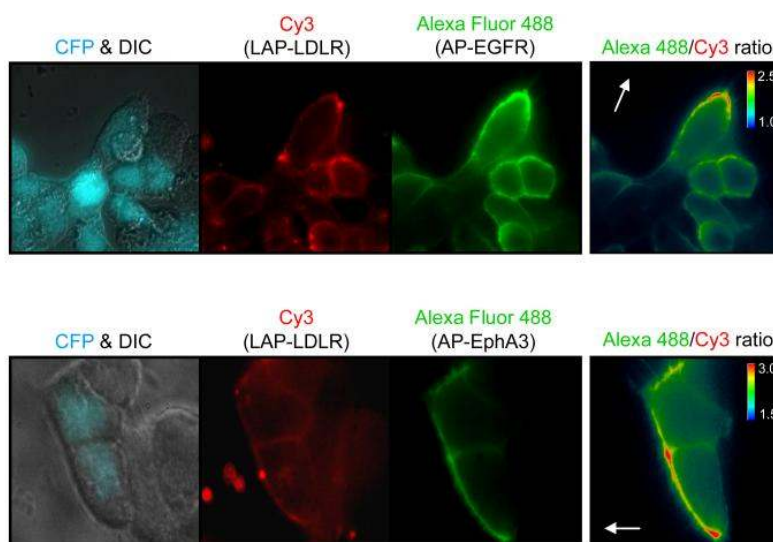
생물전자소자는 생체분자로 구성된 분자 수준에서 제어되는 전자소자로서 전자전달기능 및 에너지 변환기능 등 각종 생물분자의 특성을 이용하여 생물 메모리소자, 광수용소자, 나노바이오센서 등 광범위하게 이용될 수 있는 잠재성을 가지고 있음. 그러나 고도의 부가가치를 창출할 수 있는 생물전자소자 바이오컨텐츠로서 작용하기 위하여 적절한 **기능성 단백질의 디자인 및 개발**이 절실히 요구되고 있는 시점임. 특히 이들 생체분자의 **유/무기 물질과의 인터페이싱 기술**은 이들의 메모리소자 혹은 진단용 소자로써의 작용을 위해 필수적이라 할 수 있음. 본 과제에서는 차세대 정보저장 소자, 바이오나노 전자칩, Bio-FET 소자 등 **나노바이오 전자소자용 생체분자 최적화** 하기위한 다양한 유전학적 화학적 기술을 개발하고, 이를 활용한 **유비쿼터스형 바이오 전자소자 기술** 개발 하고자 하였음. 먼저 본 연구과제의 1 단계 연구에서 개발된 다양한 생체분자 설계 및 생산 시스템을 이용하여 지속적인 생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계 및 생산 하며 이들을 이용한 바이오컨텐츠 뱅크를 구축 세부과제에 공급하여 바이오 전자소자용으로 활용하고자 하며, 생물 전자소자용 단백질 고효율 생산시스템을 또한 지속적으로 구축하여 내포체 형성 억제, 불용성 단백질 및 rare 단백질의 수율 향상 기술을 개발하고자 함. 또한 다양한 신기능 하이브리드 단백질을 이용하여 유/무기 인터페이싱 및 생체분자 진단 프로브의 개발 등 생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술을 개발하고, 이들 생체분자 전자소자들의 진단용 전자소자로써의 응용을 위하여 다수의 FET센서 기반의 생체분석 시스템을 개발하고자 함. 이상에서 구축된 바이오전자소자용 신기능 단백질 및 전자소자 응용시스템은 차세대 미래 산업을 이끌어 갈 핵심 기술인 바이오, 나노, 전자의 융합분야인 바이오전자소자 통합시스템에 활용할 것임.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1 절 국외 연구기관

분자진화기법 혹은 생체분자 재설계를 통한 새로운 기능성을 가지는 생체분자의 제작은 자연계에서 다양한 기능을 수행하고 있는 단백질 핵산 등에 새로운 기능성을 부여 하여 바이오산업에서 많은 가능성을 보여주면 많은 연구가 이루어지고 있음. 특히 효소의 활성을 증가하거나 새로운 활성을 부여하고, 형광 단백질의 분자진화를 통하여 다양한 파장의 형광을 가지는 단백질들이 발굴 되었으며, 또한 핵산 기반의 압타머의 경우 반복적인 selection을 통하여 항체의 기능을 갖는 분자인식 핵산으로 많은 응용성을 보여주고 있음.

생체분자 재설계를 이용한 효소 활성 최적화의 예로 미국 MIT 화학과에 Alice Ting 연구팀은 lipoic acid ligase의 재설계를 통하여 화학적물질을 세포표면에 효과적으로 표지하는 방법을 개발 하여 세포 표면 단백질의 실시간 이미징 연구를 실시하였음.¹

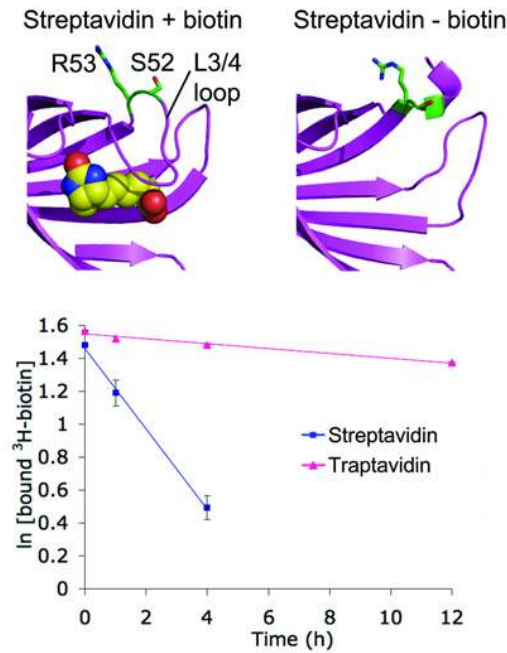


<그림 lipoic acid ligase 재설계를 통한 세포표면 이미징 기술>

표면 고정화에 관한 연구는 항체 고정화를 중심으로 연구가 이루어지고 있으나 최근에는 나노구조체에 바이오품질을 고정화하는 인터페이싱 연구가 활발히 이루어지고 있음. 하지만 생체분자들의 배열 및 고체 전자소자들과의 고정화등에 필요한 바이오인터페이싱을 위한 생체분자 개발은 아직 미흡함. 항체 고정화등에 대한 연구가 상대적으로 많이 이루어져 있으나 각각의 전자소자 혹은 디바이스에 맞추어진 간단한 인터페이싱 기술들이 사용되고 있으며 보다 Universal한 인터페이

성 생체분자의 연구가 필요함.

인터페이싱 고정화링커의 한 예로 영국 Oxford 대학 화학과에 Howarth 교수팀은 대표적인 인터페이싱 링커인 streptavidin의 더욱더 안정한 형태의 단백질을 개발하여 발표하였으며 이러한 연구는 보다 많은 유/무기 디바이스표면에서의 생체 물질 고정화에 효율적으로 사용 될 수 있음을 증명하였음.²



<그림 단백질 재설계를 통한 인터페이싱 링커 개발>

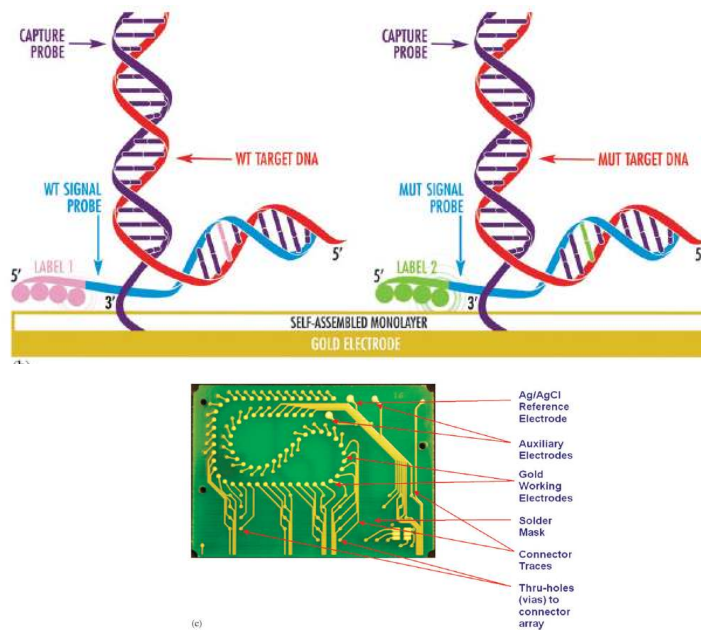
생체 분석/측정용 센서 개발 연구는 고비용과 기술개발의 복잡성으로 인해 주로 컨소시엄 형태로 연구되고 있는데, 일본은 NEC (일본전기주식회사)를 중심으로 30개 이상의 기업과 연구소가 협동연구를 하고 있으며, 미국의 경우 NIST가 주도하고 있는 CAB 컨소시엄 연구자들이 중심이 되고 있고, 영국은 65개 이상의 연구기관이 생체센서 연구에 참여하고 있는데 Cranfield Biotechnology 센터를 비롯한 몇몇 그룹은 세계적인 수준의 성과를 내고 있음.

일본의 NEC의 경우 재사용이 가능한 ISFET센서의 개발 및 POT 측정분석이 가능한 소형의 생체센서를 개발하고 있으며 특히 피부를 덮는 글루코오스 ISFET 생체센서 시제품과 피부를 통해 스며나오는 소량의 체액으로부터 혈당 수준을 측정할 수 있는 휴대용 혈당 센서를 개발 하고 있음.

전기화학적 분석 센서개발의 경우 POT 바이오센서개발의 적합성과 간편한 조작 등으로 인해 전 세계적으로도 전기신호기반 바이오센서의 개발은 많은 연구가 이루어지고 있음. 특히 효소를 이용하여 타겟 기질을 분석하는 전기센서의 경우 많

은 발전이 이루어져 사용되고 있으나 보편적으로 사용이 가능한 센서의 개발은 아직 미미한 실정임.³

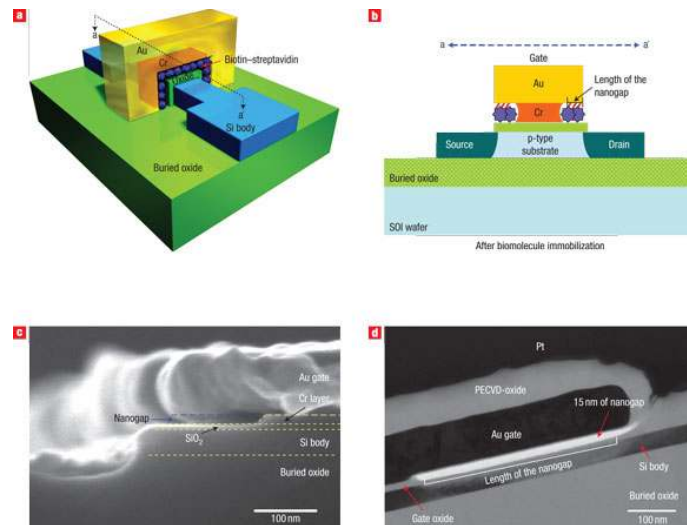
미국 GenMarkDx사의 경우 다중 유전자 분석을 위하여 여러개의 전극을 포함하는 유전자 칩을 제작하였으며 DNA의 상보적인 결합을 이용하여 전기 표지를 분석하는 칩을 상용화하였음. 항체와 달리 핵산의 경우 전기신호 표지가 상대적으로 가능하여 캐나다 Simon Fraser University에 Hua-Zhong Yu교수의 경우 핵산으로 이루어진 압타머에 전기 표지를 중합시키고 이들 압타머와 타겟 생체분자와의 결합에 인한 전기신호변화를 분석하는 바이오전기센서를 제작하였음.⁴



<그림> GenMarkDx사의 eSensor

2절 국내 연구기관

카이스트 김양규 교수님 연구팀은 FET 센서 기반의 나노 구조체를 이용하여 바이오센서를 개발하여 단백질 화합물사이의 결합을 무표지로 관찰하였음.⁵ 나노 크기의 트랜지스터의 구조체는 작은 단백질의 결합에도 큰 시그널의 변화를 보여주어 향후 무표지 바이오센서로써 큰 가능성을 보여줌.



<그림 나노 FET 바이오센서> a, Three-dimensional structure showing the silicon body (blue), the gate oxide (green) and the chromium (orange) and gold (yellow) electrodes. The narrow region of the silicon body forms the active silicon region (the channel). The chromium layer is partially etched to form an air gap that can be filled with biomolecules. b, A cross-section of the device along the direction of the dotted line in a shows the filled nanogap. Source and drain electrodes are formed by implanting phosphorous in the silicon body. c, Scanning electron micrograph of a 200-nm-long nanogap. d, Transmission electron micrograph (TEM) of a 400-nm-long nanogap. To reduce damage from the electron beam, a SiO₂ layer (PECVD-oxide) is deposited on the gold layer using plasma-enhanced chemical vapour deposition (PECVD). Platinum is deposited as a background material of TEM. In the image, platinum and gold appear black due to their high atomic number, and the nanogap region appears white.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 연구개발수행 내용

1. 생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계, 생산 및 바이오컨텐츠 बैं크 구축

- ◆ 돌연변이 유발 세포주를 이용한 MBP의 in vivo 방향성 분자진화 기술 개발 및 라이브러리 구축
- ◆ In vitro 방향성 분자진화 기법을 이용한 말토오스 유도 구조변화 기반 기능성 분자 스위치 단백질 개발
- ◆ RNA구조 특이적 단백질컨텐츠의 확보 및 신규 RNA 결합 단백질 बैं크 구축
- ◆ 인터페이싱 링커 단백질컨텐츠 확보

2. 생물전자소자용 단백질 고효율 발현 및 생산시스템 개발

- ◆ 카스파제-3 단백질 분해효소 기반 DEVD/IETD 모티프를 이용한 one-step 다중생산 시스템 구현
- ◆ One-step 다중생산 시스템 기반 3종 단백질 동시다발적 분리 [MBP, RFP, MBP-RFP]
- ◆ 대사 조절 대장균의 확보를 통한 단백질 고효율 발현 기술 구현
- ◆ One-step biotin label된 단백질의 효율적 생산 시스템 구축

3. 생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술 개발

- ◆ 생체분자 고효율 표면 고정화를 위한 재설계 기술 개발 [mutimer 페레독신, 형광단백질]
- ◆ 전자소자 표면 밀도개선을 위한 바이오 인터페이스 기술 개발 [글루코즈옥시다제 변이체-GOD6R]
- ◆ RNA 결합 프로브를 이용한 인터페이싱 마이크로 RNA 분석 기술 개발
- ◆ 생체분자의 전기화학적 분석을 위한 생물전자소자 프로브 개발

4. FET 센서 기반 생체분석 시스템 개발

- ◆ ISFET 센서를 이용한 콘카타머 MBP의 구조변화 모니터링
- ◆ ISFET 소자를 이용한 글루코오스 유도 헥소키나아제 구조변화의 ISFET 측정
- ◆ 항체가 고정된 ISFET 바이오센서 개발을 통한 CRP 모니터링 기술 개발
- ◆ 금속 표면을 포함하는 MOSFET센서 시스템 개발
- ◆ DNA 결합을 이용한 p53 단백질 및 변이 단백질의 검출

2절 연구개발수행 결과

1. 생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계, 생산 및 바이오컨텐츠 뱅크 구축

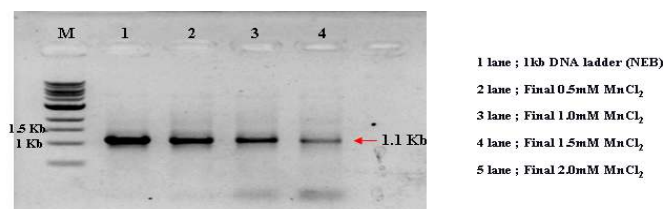
기능성 단백질을 개발함에 있어 새롭고 향상된 특성을 갖는 단백질을 만들기 위해 사용되는 중요한 핵심은 분자의 다양성을 만드는 기술과, 원하는 특성을 갖는 단백질을 스크리닝 하거나 선별하는 기술임.

생물의 형태나 특성을 결정짓는 것은 1차적으로 유전정보를 담고 있는 유전자로서 DNA로 구성되며, 진화의 주체라고 할 수 있고 이러한 다양성과 생존이라는 끊임없이 변화하는 자연의 진화과정을 인위적인 방법으로 모방한 기술이 Directed Molecular Evolution (방향성 분자진화) 기법인데, 새로운 기능을 가진 단백질 또는 기능이 향상된 단백질을 개발하기 위해서 방향성 분자진화 스크리닝 기술이 주로 이용되고 있음.

본 연구에서는 표준 PCR (polymerase chain reaction) 프로토콜을 변형시킴으로서 DNA 중합효소의 더 높은 실수 빈도를 유발시키고자 하였으며, 자연 상태에서 수천 ~ 수만 년에 걸쳐 일어나는 유전자의 진화과정을 수일 내에 실험실에서 재현할 수 있는 분자생물학 기반 방향성 진화기법을 도입함으로써, 바이오 전자소자용으로서 활용을 위해 새로운 기능을 가진 또는 기능이 향상된 생체분자를 개발하고자 함.

<그림 1-1> 및 <그림 1-2>에서 보는 것처럼 분자진화의 실험적 접근방식으로 *in vitro* 및 *in vivo* 두 가지 기법을 사용하였는데 *in vitro* 방식으로 Error-prone PCR 기법, DNA-Shuffling 기법 및 Site-Directed Mutagenesis 기술을 사용하였으며, *in vivo* 방식으로 Mutator Cell을 이용한 무작위 돌연변이 유발 기법을 사용함.

사용된 MBP 단백질의 프라이머 및 PCR 조건은 아래와 같으며, 최종 1.5 mM의 MnCl₂를 이용하여 무작위 돌연변이 (random mutation)를 유도함 <그림 1-1>.



Used primer

EcMBP(E)-F CGAATTCATGAAAACCTGAAGAAGGTAACCT

EcMBP(H)-R CGAAGCTTAGTCTGCGGCTCTTTCAGG

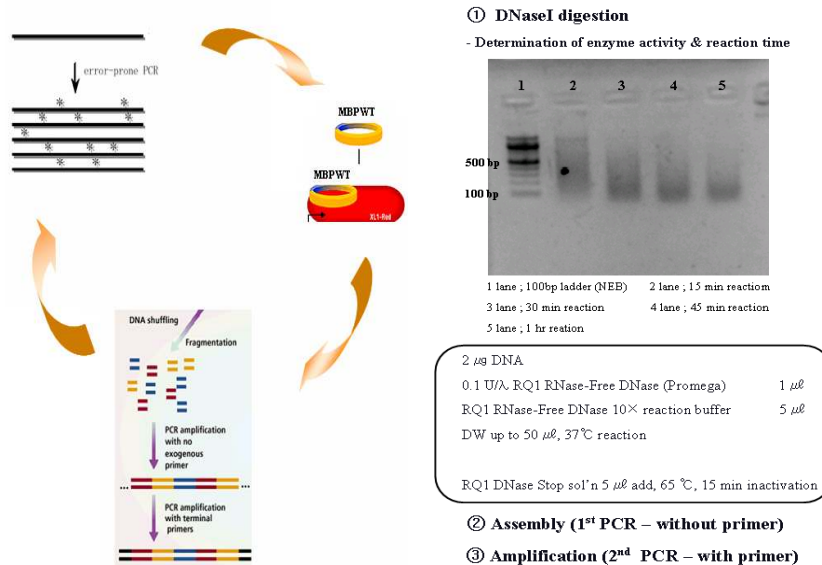
PCR condition

95°C - 5'00" / 94°C - 0'30", 55°C - 0'30", 72°C - 1'20" (25 cycles) / 72°C - 7'00"

(Uni Taq / Bioprogen社 사용)

<그림 1-1> 방향성 분자진화를 위한 EP PCR (Error-prone PCR) 기법

상동성 DNA 서열들을 DNA 분해효소로 자르고 DNA 중합효소에 의해 촉매되는 self-priming chain extension 방식에 의해 재조합 시키는 기술인 DNA-shuffling 기법을 이용하여 돌연변이 라이브러리를 구축함. 약 10-50 bp 길이의 dsDNA 단편을 생산하기 위해 DNase I 효소로 처리하고, 생산된 단편들은 모체 template를 annealing 하는 반복된 사이클과 DNA 중합효소에 의한 중합반응으로 구성된 PCR 반응에 의해 완전한 길이의 유전자로 재조합됨 <그림 1-2>.



<그림 1-2> 기능성 MBP 개발을 위한 DNA-shuffling 모식도

Mutant library의 초고속 스크리닝을 위해 acceptor molecule과 donor molecule을 각각 MBP (maltose-binding-domain)와 융합하고, MBP의 양 말단에 accept / donor molecule을 융합하여 FRET (fluorescence resonance energy transfer)이 일어나도록 야기한 대조군의 단백질을 동일한 조건 하에 발현시켰으며, 단백질들은 농도를 달리하여 FRET이 일어나는 현상을 530/480 emission ratio를 통해 분석함 <그림 1-3>.

CMY conc.	w/o maltose	with maltose	change in 530/480ration
100 ng/ μ l	0.87	1.01	0.07
10 ng/ μ l	0.45	0.51	0.06
1 ng/ μ l	0.50	0.52	0.02
100 pg/ μ l	0.41	0.51	0.10
10 pg/ μ l	0.43	0.51	0.08
1 pg/ μ l	0.43	0.51	0.08
100 fg/ μ l	0.41	0.51	0.09

<그림 1-3> 말토오스 유도 구조변화 단백질 MBP의 FRET 분석

96-웰 플레이트를 이용하여 배양하였을 경우에 발현되는 단백질의 양이 Fluorimeter가 인지하는 데에 충분한지의 여부는 SDS-PAGE를 통해 확인하였으며, 그 양은 LB 배지보다 TB 배지를 사용했을 때 더 많이 발현되었음.

사용된 96-웰 플레이트는 재질이나 색깔에 따른 빛의 산란 및 분산에 의해 그 값이 어떻게 변화하는지를 보고 Perkin-Elmer의 96-웰 플레이트를 사용하기로 하였으며, 선별된 변이체는 530/480 emission ratio를 통해 스펙트럼 분석으로 우선 선별하고, DNA 염기서열 분석을 통해 돌연변이가 일어난 아미노산의 서열을 분석함.

[MBP mutant library construction - (1) Mutants cloning]

I. EtOH 침강

- EcoR I HindIII로 잘라 놓은 벡터 : 인서트의 molar ratio가 1:3이 되도록 정량된 DNA를 섞음.
- 1/10 부피의 3 M NaOAc (pH 5.2)를 넣고 섞음.
- 최종 0.5 ug/ul 농도가 되도록 글리코젠을 넣은 뒤, 2배에 달하는 2-프로판올을 넣음.
- -70°C에 20분간 방치해 둔 뒤 원심분리를 이용하여 DNA 펠렛을 얻음.

II. Ligation (접합)

- DNA 펠렛에 3차 멸균 증류수 18 ul 넣음.
- 10×버퍼 2 ul와 T4 DNA ligase (1U/ul, Fermentase)를 넣고 섞음.

III. 형질전환

- KRX 형질전환용 세포에 200 ul에 ligation 혼합물을 넣고 섞음.
- 42°C / 15초 열충격 가함.
- SOC 450 ul 넣고 1시간 배양후 배지에 도포함.

[MBP mutant library construction - (2) Mutants screening]

I. 고체 배지 위의 콜로니들은 멸균 이쑤시개를 이용하여 96-웰 플레이트의 액체 배지에 접종하고 동일 클론은 고체 배지에 찍어 마스터 플레이트를 만들어 4°C 보관함.

II. 최종 0.2% rhamnose와 1 mM IPTG, 50 ug/ul 카나마이신 배지에서 37°C, 200 rpm의 조건으로 24시간 배양한 세포들은 원심분리를 통해 얻었으며, 얻어진 cell들은 1X PBS로 1회 세척함.

III. 최종 cellytic B 500 ul 분주한 뒤 37°C에서 1시간 정치 배양하여 세포를 파쇄함.

IV. 원심분리를 통해 상등액만 취한 뒤 LS55를 이용하여 436 nm의 파장을 가해주었을 때 480 nm와 530 nm에서 나타나는 형광 세기를 측정함.

V. 최종 10 mM의 말토오스를 넣고 37°C에서 1시간 정치 배양한 뒤 IV에서와 같이 형광 세기를 측정함.

VI. 말토오스의 유무에 따른 530/480 ratio 변화를 계산한 뒤 wild type으로 사용된 CMY보다 530/480 ratio값이 큰 것을 1차 후보 단백질로 선별함.

본 실험에서는 CMY의 농도에 따른 530/480 ratio 변화가 0.1 내외를 나타내었으며, 0.1보다 큰 ratio를 나타내는 1차 candidate를 선별하였음.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	0.06	0.07	0.07	0.07	0.04	0.03	0.04	0.06	0.00	-0.01	0.04	0.10
B	0.04	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.08	0.02	0.10	0.05	0.11
C	0.04	0.04	0.04	0.08	0.05	0.06	0.05	0.11	0.06	0.15	0.01	0.06
D	0.03	0.06	0.02	0.03	0.02	0.08	0.07	0.07	0.04	0.08	0.06	0.03
E	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.01	0.01	0.01	0.03	0.06	0.09	0.05
F	0.04	0.02	0.05	0.03	0.04	0.08	0.03	0.05	0.07	0.08	0.09	-0.03
G	0.05	0.04	0.07	-0.04	-0.04	0.07	0.06	0.05	0.07	0.06	0.08	0.09
H	0.00	0.04	0.08	0.03	0.09	0.02	0.04	0.01	0.08	0.02	0.07	0.05

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	0.00	0.00	0.01	-0.10	0.00	0.01	0.02	0.00	0.02	0.02	0.02	0.01
B	-0.02	0.05	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.01	0.02	0.01	-0.08
C	0.02	0.03	-0.03	0.03	0.02	0.52	0.04	0.07	0.05	0.04	0.04	0.02
D	0.03	0.05	0.03	0.01	0.01	0.05	-0.03	0.03	0.00	0.01	0.03	0.02
E	0.04	0.00	0.05	0.01	0.02	0.51	0.01	0.02	0.06	0.02	0.02	0.02
F	0.01	0.01	0.03	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02
G	0.00	0.01	0.02	-0.01	0.00	0.03	0.01	0.00	0.01	-0.03	0.01	0.01
H	-0.09	-0.02	0.00	-0.01	-0.01	-0.02	-0.01	-0.01	-0.02	-0.01	-0.07	-0.02

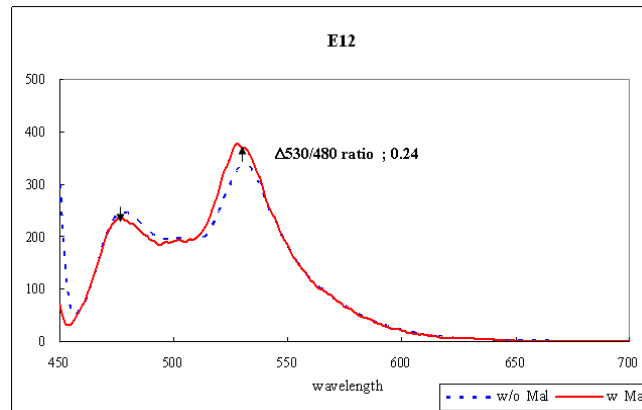
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	0.06	0.07	0.07	0.07	0.04	0.03	0.04	0.06	0.00	-0.01	0.04	0.10
B	0.04	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.08	0.02	0.10	0.05	0.11
C	0.04	0.04	0.04	0.08	0.05	0.06	0.05	0.11	0.06	0.15	0.01	0.06
D	0.03	0.06	0.02	0.03	0.02	0.08	0.07	0.07	0.04	0.08	0.06	0.03
E	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.01	0.01	0.01	0.03	0.06	0.09	0.05
F	0.04	0.02	0.05	0.03	0.04	0.08	0.03	0.05	0.07	0.08	0.09	-0.03
G	0.05	0.04	0.07	-0.04	-0.04	0.07	0.06	0.05	0.07	0.06	0.08	0.09
H	0.00	0.04	0.08	0.03	0.09	0.02	0.04	0.01	0.08	0.02	0.07	0.05

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	0.05	0.12	0.10	0.13	0.08	0.08	0.09	0.08	0.11	0.11	0.12	0.11
B	0.07	0.09	0.10	0.11	0.12	0.08	0.08	0.12	0.11	0.12	0.12	0.12
C	0.06	0.09	0.09	0.10	0.09	0.10	0.07	0.10	0.09	0.11	0.14	0.11
D	0.13	0.15	0.11	0.10	0.11	0.10	0.10	0.09	0.12	0.11	0.10	0.12
E	0.13	0.13	0.12	0.12	0.09	0.08	0.10	0.11	0.08	0.11	0.10	0.16
F	0.12	0.12	0.11	0.07	0.14	0.09	0.11	0.10	0.11	0.10	0.13	0.12
G	0.12	0.14	0.12	0.07	0.08	0.10	0.13	0.12	0.08	0.06	0.08	0.14
H	0.11	0.11	0.12	0.10	0.07	0.05	0.10	0.10	0.06	0.07	0.08	0.12

<그림 1-4> 말토오스 유도 구조변화 단백질 MBP의 방향성 분자진화 스크리닝

대부분의 mutant lysate는 wild type과 비슷한 수준의 530/480 ratio를 나타내었으며 그 중 0.15 이상의 clone은 변이 MBP를 정제하여 정확한 ratio 변화를 측정함 <그림 1-4>.

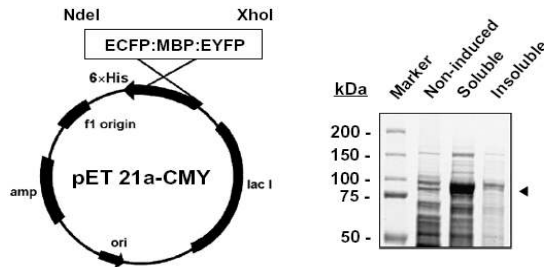
530/480 ratio 측정 결과 E12를 제외한 1차 candidate들 대부분이 <1.0(1.2)의 ratio값으로 wild type과 다른 특이성을 보이지 않음 <그림 1-4, 1-5>.



<그림 1-5> E12 돌연변이 단백질의 FRET 분석

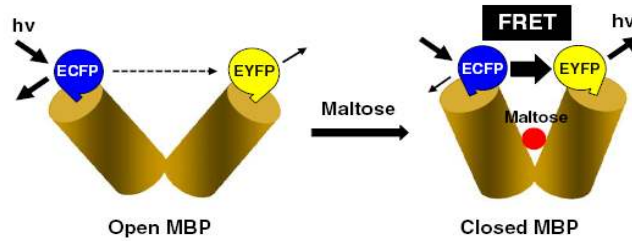
본 연구에서는 유전자 재설계를 통하여 Maltose binding protein (MBP)의 구조변화 모니터링을 위하여 형광 단백질의 융합과 이를 이용한 FRET센서를 개발하였음.

MBP 구조 변화에 따른 FRET변화를 살펴보기 위하여 MBP Carboxyl 말단에 ECFP형광 단백질을 융합하고 N-말단에 EYFP형광 단백질을 융합하였음 <그림 1-6>. ECFP의 경우 436nm에서 excitation이 되어 488 nm에서 최대 형광을 보여주며 EYFP의 경우 517 nm에서 최대 흡수를 보여주어 528 nm에서 최대 형광을 보여줌.



<그림 1-6> pET 21a 발현 벡터에 제작된 ECFP:MBP:EYFP FRET 센서 단백질

MBP의 경우 maltose의 결합에 의하여 구조적인 변화를 보여주면 전연도 본 연구진에서는 이러한 구조적 변화를 FRET센서 시스템을 이용하여 분석하였으며 당해연도 연구에서는 FRET signal을 분석하여 이러한 MBP단백질의 구조적 변화를 관찰 하였음 <그림 1-7>.

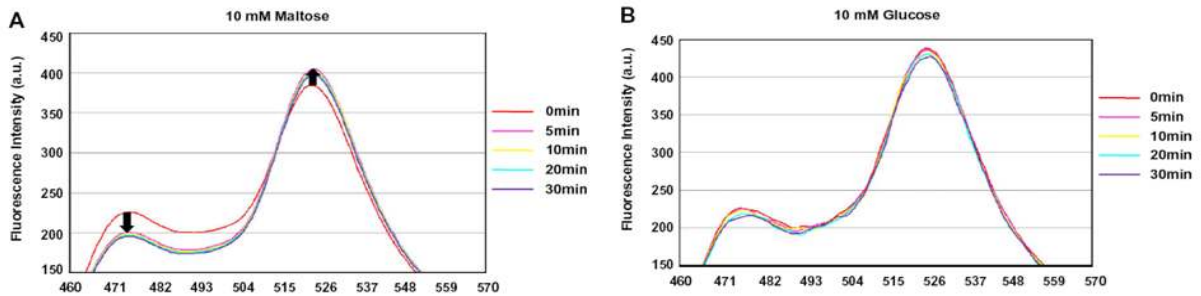


<그림 1-7> MBP maltose 결합 특이적 FRET 센서

FRET 센서에서의 signal은 두 개의 형광 중 acceptor (EYFP)의 형광 emission의 증가 혹은 donor (ECFP)의 형광 emission의 감소로 나타 낼 수 있고, 이러한 FRET efficiency (E)는 두 형광 사이의 거리에 6승에 반비례 하게 되며, 다음과 같은 방정식을 보여줌: $E = Ro^6 / (Ro^6 + R^6)$. Ro는 50%의 FRET efficiency를 보여줄때의 형광 단백질간의 거리이며 R은 실제 거리를 나타냄. ECFP와 EYFP는 FRET을 위하여 많이 사용되어지고 있는 형광 단백질 pair이며 약 4.9 nm의 Ro를 가지고 있으며 두 형광 사이의 거리가 1-10 nm사이에서 FRET이 일어난다고 알려져 있음. 본 연구에서는 (10 mM) maltose를 가함에 따라 변화하는 FRET signal을 관찰하기 위하여 두 형광 단백질의 emission (ECFP: 475 nm, EYFP: 527 nm)을 모니터 하였음.

실험시 donor의 emission세기를 이용하여 FRET efficiency등을 계산 할 수 있으며 다음과 같은 방정식을 따름: $E = 1 - (I_{DA}/I_D)$. 이때 I_{DA} 와 I_D 는 각각 결합하는 리간드의 유무에 따른 donor의 emission세기를 나타내고 이들 donor와 acceptor형광단백질의 거리는 다음과 같이 나타낼수 있음: $R = Ro(I_{DA}/(I_D - I_{DA}))^{1/6}$.

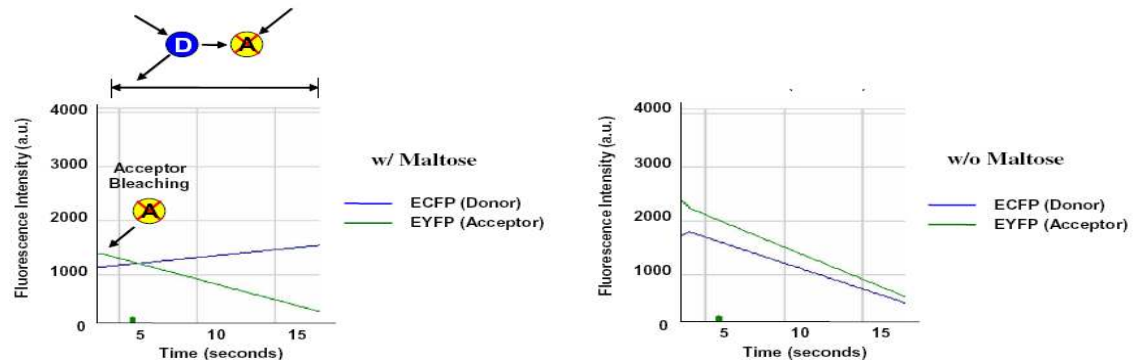
<그림 1-8>은 maltose와의 결합에 의해서 변화하는 형광 emission spectra를 보여주고 있으며 negative control실험을 위하여 10 mM Glucose를 사용하였음. Maltose를 가한 FRET 센서에서만 475 nm에서의 형광의 감소와 527 nm에서의 형광의 증가를 관찰 할 수 있었고, Glucose에 의해서는 형광의 변화가 없음을 관찰하였음.



<그림 1-8> Maltose 혹은 Glucose와 결합한 MBP FRET 센서의 형광 emission spectra

Maltose 결합에 따른 FRET 시그널 결과에 따라 FRET 센서의 경우 약 0.11의 FRET efficiency를 보여주고, 형광 단백질간의 거리는 약 6.93 nm로 계산되어짐. 또한 이러한 FRET 시그널의 변화는 약 5분정도에서 이루어지는 것을 볼 수 있었음.

본 연구에서는 이러한 FRET 센서의 검증으로 acceptor 형광 photobleaching 실험을 실시하였으며 <그림 1-9>에서 볼 수 있듯이 EYFP의 photobleaching을 실시함에 따라 maltose가 있을 경우에서만 donor (ECFP)의 형광 세기가 증가하는 것을 볼 수 있었음. 본 실험을 위하여 ECFP:MBP:EYFP의 FRET 센서 단백질을 E coli에서 발현 시키고 confocal laser-scanning microscope로 photobleaching과 각각의 형광 단백질의 emission을 관찰하였음. Photobleaching은 514 nm에서 이루어졌고, maltose 결합이 없는 경우 donor와 acceptor 단백질 모두에서 bleaching이 일어나는 것이 관찰되었음.



<그림 1-9> acceptor photobleaching 실험

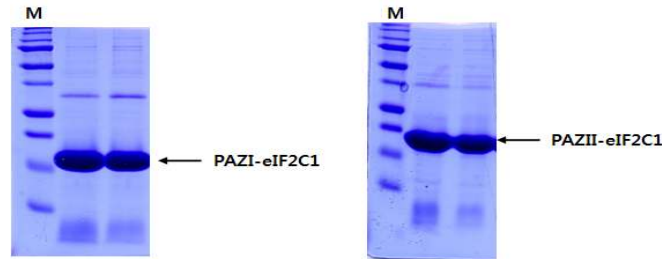
본 연구에서는 또한 바이오전자소자용 바이오컨텐츠 발굴의 일환으로 특정 RNA 구조에 특이적으로 결합 할 수 있는 다양한 단백질 도메인을 발굴 하였으며 또한 이들 도메인들을 이용하여 새로운 RNA binder를 재설계하였음.

PAZ 도메인은 다양한 RNA 대사에 관여하는 단백질에 포함되어 있으며 double-stranded RNA (dsRNA)의 3' overhang에 결합하는 도메인이며 본 연구에서는 Human eIF2C1의 PAZ 도메인과 Human Dicer의 PAZ 도메인을 각각 클로닝하여 발현 정제하였음. HeLa cell의 total RNA를 뽑은 후에 cDNA를 합성하여 증합사슬반응으로 유전자 증폭을 하였음.

각각의 primer를 이용하여 증폭된 증합사슬반응의 산물은 DNA purification kit를 이용하여 정제한 후에 제한효소(*NdeI*와 *XhoI*)으로 자른 후에 미리 제한효소(*NdeI*와 *XhoI*)으로 자른 pET28a vector에 ligation반응을 하여 pET-PAZI-eIF2C1, pET-PAZII-eIF2C1, 그리고 pET-PAZ-dicer의 클론을 확보하였음.

제작된 pET-PAZI-eIF2C1, pET-PAZII-eIF2C1, 그리고 pET-PAZ-dicer에 의해 형질 전환된 *E. coli* BL21을 37°C에서 O.D. (optical density, A600nm) 0.6이 될 때까지 진탕 배양 후, 총 농도 1 mM의 IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 25°C에서 단백질 발현을 유도하였음. 14시간 후, 세포를 원심 분리하여 얻은 대장균을 초음파 (Branson, Sonifier450, 3 KHz, 3 W, 5 min)로 파쇄 한 후, 전체 단백질 용액을 얻었고 원심분리를 통

해 용해성 분획 단백질용액과 비용해성 분획 단백질로 분리하여 용액을 각각 얻었음. PAZI-eIF2C1, PAZII-eIF2C1는 용해성 단백질로 잘 발현이 되지만 PAZ-dicer는 비용해성 단백질로 발현되는 것을 확인할 수 있었고 비용해성 단백질로 발현되는 PAZ-dicer를 제외하고 PAZI-eIF2C1, PAZII-eIF2C1를 발현한 후에 얻어진 용해성 단백질 용액에 0.1% polyethylenimine을 처리하여 뉴클레오타이드를 제거한 다음 투석을 통해 남아있는 polyethylenimine을 제거하고 후에 얻어진 용액을 정제하기 위해서 IDA excellulose로 충전되어진 컬럼에 세포를 파쇄한 용액을 로딩하여 재조합단백질을 용리 용액(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, pH 8.0, 0.25 M imimidazole)으로 용리하였음. <그림 1-10>



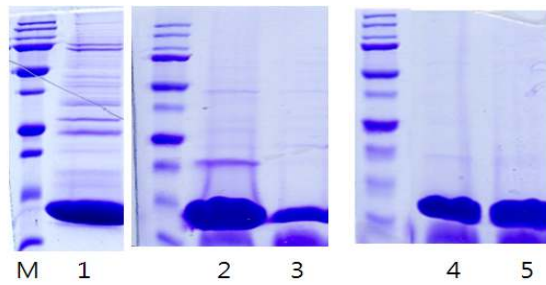
<그림 1-10> PAZ 도메인 발현 정제

double stranded RNA binding motif(dsRBD)는 다양한 단백질의 두 가닥의 RNA 결합을 증개하는 도메인으로 65-70개의 아미노산으로 구성되어있고, 이 도메인은 double stranded RNA binding motif of human dicer, *Xenopus laevis* RNA binding protein A (XlrpA), *Aquifexaolicus* RNaseIII (Aa-RNaseIII), *Drosophila staufen*, 그리고 *Escherichia coli* RNase III (Ec-RNase III)등에 포함되어있음.

본 연구에서는 위의 유전자의 도메인을 각각 cloning하여 cDNA 유전자를 확보 하였음. human dicer의 double stranded RNA binding motif는 HeLa cell의 total RNA를 뽑은 후에 cDNA를 합성하여, *Escherichiacoli* RNaseIII의 double stranded RNA binding motif는 *Escherichia coli*의 게놈 DNA로부터, 그리고 *Xenopus laevis* RNA binding protein A (XlrpA), *Aquifexaolicus* RNaseIII (Aa-RNaseIII), 그리고 *Drosophila staufen*는 주형 DNA를 얻기 위해 알려진 서열을 바탕으로 primer를 합성하여 중합사슬반응을 통해 유전자를 증폭 하였음. 이러한 5개의 dsRBD 도메인들의 유전자는 위와 마찬가지로 pET28a 발현 벡터에 클로닝이 되어 확보되었음.

제작된 pET-Dicer-dsRBD, pET-*Escherichia coli* RNase III (Ec-RNase III)-dsRBD, pET- *Xenopus laevis* RNA-binding protein A (XlrpA)- dsRBD, pET- *Aquifex aolicus* RNase III (Aa-RNase III)- dsRBD 그리고 pET- *Drosophila staufen*-dsRBD 에 의해 형질 전환된 E. coli BL21을 37°C에서 O.D. (optical density, A600nm) 0.6이 될 때까지 진탕 배양 후, 총 농도 1 mM의 IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 25°C에서 단백질 발현을 유도하였음. 14시간 후, 세포를 원심 분리하여 얻은 대장균을 초음파 (Branson, Sonifier450, 3 KHz, 3 W, 5 min)로 파쇄 한 후, 전체 단백질 용액을 얻었고 원심분리를 통해 용해성 분획 단백질용액과 비용해성 분획 단백질로 분리하여 용액을 각각 얻었음.

dsRBD 도메인의 경우 단백질의 크기가 작아 용해성 단백질을 분리하여 정제를 한 다음에 단백질의 발현 유무를 확인하였으며 pET-Dicer-dsRBD, pET-*Escherichia coli* RNase III (Ec-RNase III)-dsRBD, pET- *Xenopus laevis* RNA-binding protein A (XlrpA)- dsRBD, pET- *Aquifex aolicus* RNase III (Aa-RNase III)- dsRBD 그리고 pET- *Drosophila staufen*-dsRBD 를 발현한 후에 얻어진 용해성 단백질 용액에 0.1% polyethylenimine을 처리하여 뉴클레오타이드를 제거한 다음 투석을 통해 남아있는 polyethylenimine을 제거하고 후에 얻어진 용액을 정제하기 위해서 IDA excellulose로 충전되어진 컬럼에 세포를 파쇄한 용액을 로딩 정제하였음. <그림 1-11>



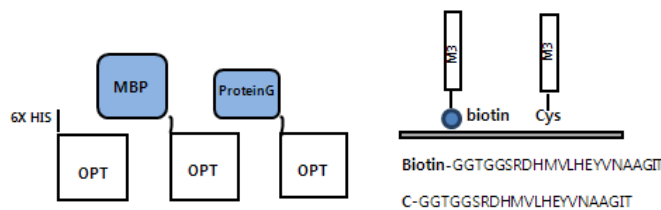
1: Dicer-dsRBD
 2: *Aquifex aeolicus* RNase III (Aa-RNase III)- dsRBD
 3: *Drosophila staufer*-dsRBD
 4: *Xenopus laevis* RNA-binding protein A (XlrpA)- dsRBD
 5: *Escherichia coli* RNase III (Ec-RNase III)-dsRBD

<그림 1-11> 5종의 dsRBD 도메인 발현 정제

본 연구에서는 또한 자기결합 형광 단백질, 아미딘 변형체, 항체결합 단백질 변형체 등 5종 이상의 인터페이싱 링커 단백질 배크를 구축하였음.

OPT 단백질과 M3 펩티드는 각각 GFP 1-10과 GFP11을 유전자 변형을 통해 용해성을 증가시킨 것으로 OPT와 M3의 결합력은 매우 강하며, 결합이 일어나면 기존의 GFP와 같은 파장의 형광을 내는 특징을 가짐.⁶ Chip 표면에 M3 펩티드를 먼저 고정하고 OPT의 N 말단에 원하는 단백질을 융합하여 펩티드가 고정된 표면에 처리하면 M3와 OPT의 결합에 의해 원하는 단백질을 위치특이적으로 고정화 할 수 있을 뿐 아니라 이 때 발생하는 형광을 통해 단백질의 고정화를 확인 할 수 있음.

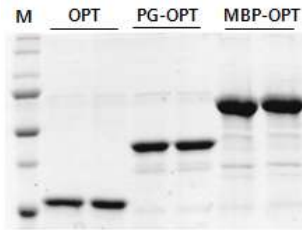
본 연구에서는 여러 종류의 단백질을 고정화 시키기 위해 OPT, Protein G-OPT, MBP-OPT 단백질을 발현하여 확보 하였고, M3 펩티드의 표면 위 고정을 위해 M3 펩티드 말단에 각각 biotin과 Cys가 도입 된 펩티드를 합성하였음 <그림 1-12>.



<그림 1-12> OPT fusion 단백질 및 고정화 펩타이드

먼저 GFP1-10의 유전자 변형을 통해 OPT 유전자를 확보 하였고 OPT 유전자와 Protein G-OPT가 융합된 유전자를 pET28a 발현 벡터에 클로닝, MBP-OPT를 발현 할 수 있도록 pMAL-c2X 발현 벡터에 OPT 유전자를 클로닝하여 pET-OPT, pET-Protein G-OPT, pMAL-OPT 클론을 확보하였음.

제작된 pET-OPT, pET-Protein G-OPT, pMAL-OPT에 의해 형질전환 된 *E. coli* BL21 을 37°C 에서 O.D. (optical density, 600nm) 0.6이 될 때까지 진탕 배양 후, 총 농도 1mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 20°C 에서 단백질 발현을 유도하였음. 14시간 후, 세포를 원심분리하여 얻은 대장균을 초음파 (Branson, Sonifier450, 3 KHz, 3 W, 10 min)로 파쇄 한 후, 전체 단백질 용액을 얻었고 원심분리를 통해 용해성 분획 단백질을 분리하였다. 단백질 정제를 위해 IDA excellulose로 충전되어진 컬럼에 분리한 용해성 분획 단백질을 로딩한 후 용리 용액 (50mM Tris-Cl pH8.0, 0.5M NaCl, 0.25M imidazole)으로 재조합단백질을 용리하였음 <그림 1-13>.



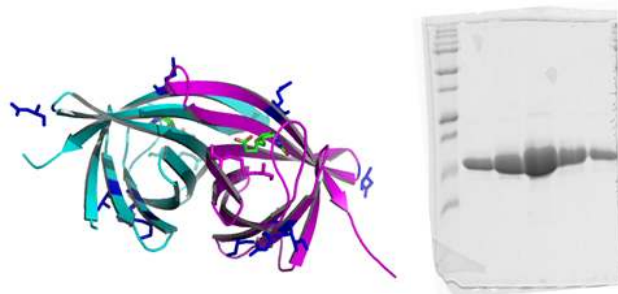
<그림 1-13> OPT fusion 단백질 발현 정제

또 다른 중요한 인터페이싱 단백질로 본 연구에서는 아비딘의 다이머 형태인 rhizavidin을 확보하였음. Rhizavidin은 N-terminal에 두 개의 putative signal peptide (24개의 아미노산과 20개의 아미노산)을 포함하고 있으며 두 개의 N-terminal putative signal peptide을 자른 Rhizavidin은 mature form의 Rhizavidin과 같음. 두 개의 N-terminal putative signal peptide을 자른 Rhizavidin 유전자는 확보된 Rhizavidin 유전자로부터 중합 사슬반응기법을 통해 pET21a에 삽입하여 pET21a-Rhizavidin의 클론을 확보하였음.

Rhizavidin의 표면 고정을 극대화하기 위해서 Rhizavidin의 유전자를 28 I→K, 38 S→K, 그리고 40 Q → K로 point mutation한 pET21a-K3-Rhizavidin 클론과 28 I→K, 38 S→K, 40 Q → K, 94 N→K, 그리고 118 Q→K 로 point mutation한 pET21a-K5-Rhizavidin 클론을 확보하였음.

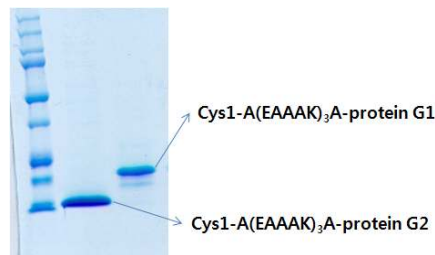
제작된 pET21a-Rhizavidin, pET-K3-Rhizavidin, 그리고 pET-K5-Rhizavidin에 의해 형질 전환된 E. coli BL21 (pLysS)을 37°C에서 O.D. (optical density, A600nm) 0.9이 될 때 까지 진탕 배양 후, 총 농도 1 mM의 IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 37°C에서 단백질 발현을 유도하였음. 3시간 후, 세포를 원심 분리하여 얻은 대장균을 초음파 (Branson, Sonifier450, 3 KHz, 3 W, 5 min)로 파쇄 한 후, 전체 단백질 용액을 얻었고 원심분리를 통해 용해성 분획 단백질용액과 비용해성 분획 단백질로 분리하여 용액을 각각 얻었음. 위에서 얻어진 단백질 용액을 완충액(12 mM Tris-Cl, pH 6.8, 5% 글리세롤, 2.88 mM 머캅토에탄올, 0.4% SDS, 0.02% 브롬화페놀 블루)과 혼합하여 100°C에서 5분간 가열 후 1mm 두께의 15% 분리 젤 (pH 8.8, 가로 20 cm, 세로 10 cm) 위에 5% 저장 젤 (pH 6.8, 가로 10 cm, 세로 12.0 cm)을 덮은 폴리아크릴아마이드 젤에 로딩한 후 200-100 V, 25 mA로 1시간 동안 전기영동하고 쿠마시 염색액으로 염색하여 재조합 단백질을 확인하였음. 확인한 결과, Rhizavidin, K3-Rhizavidin, 그리고 K5-Rhizavidin 단백질 모두 비용해성 단백질로 많은 양 발현되는 것을 확인할 수 있었음.

비용해성 단백질로 발현되는 Rhizavidin, K3-Rhizavidin, 그리고 K5-Rhizavidin 단백질을 각각 6M guanidinium hydrochloride/ 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 용액으로 현탁시킴. 그 각각의 현탁액은 PBS용액으로 빠르게 희석하여 refolding함. Refolding된 단백질은 2-iminobiotin-sepharose 4-Fast flow이 충전되어진 컬럼에 로딩하였음. 2-iminobiotin-sepharose에 결합되어 있는 각각의 단백질은 용리 용액(0.1M acetic acid, pH 2.9)으로 용리하였음 <그림 1-14>.



<그림 1-14> 아비딘 다이머 Rhizavidin 리폴딩에 의한 생산 및 정제

본 연구에서는 또한 항체고정화 단백질인 protein G의 알파 헬릭스 링커 단백질을 추가하여 균일한 고정화가 가능한 protein G 변형체를 확보하였음. protein G1과 protein G2를 coding하는 유전자의 앞에 Cys1-A(EAAAK)₃A를 coding하는 유전자를 첨가하여 중합사슬반응기법을 통해 pET21a vector에 삽입하여 pET21a-Cys1-A(EAAAK)₃A-proteinG1과 pET21a-Cys1-A(EAAAK)₃A-proteinG2의 클론을 확보하였음. 제작된 Cys1-A(EAAAK)₃A-proteinG1와 Cys1-A(EAAAK)₃A-proteinG2는 E. coli BL21에서 발현함. 발현 조건은 37°C에서 O.D. (optical density, A600nm) 0.6이 될 때까지 진탕 배양 후, 총 농도 1 mM의 IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 14시간 동안 25°C에서 단백질 발현을 유도함. 얻은 대장균은 파쇄 한 후, 원심분리를 통해 용해성 분획 단백질용액만 얻음. 얻어진 용액은 정제하기 위해서 IDA excellulose로 충전되어진 컬럼에 로딩함. IDA excellulose에 결합되어 Cys1-A(EAAAK)₃A-proteinG1와 Cys1-A(EAAAK)₃A-proteinG2는 용리 용액(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, pH 8.0, 0.25 M imidazole)으로 용리함. <그림 1-15>

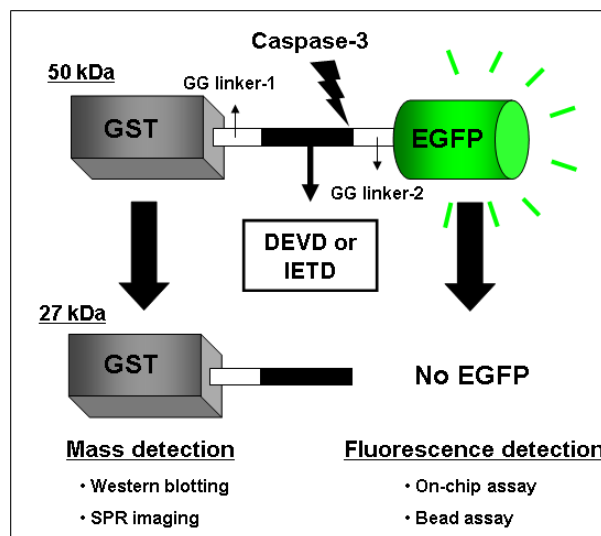


<그림 1-15> 항체고정화 단백질 protein G 링커 변형체 확보

2. 생물전자소자용 단백질 고효율 발현 및 생산시스템 개발

카스파제-3은 아포토시스의 과정에서 중요한 핵심 역할을 하는 것으로 알려져 있는 것으로써, 카스파제-3의 조절은 아포토시스 경로를 타겟으로 하는 치료전략을 가능함. 활성화된 카스파제-3은 DEVD 아미노산 서열에 대한 분해활성을 가지며, DEVD 서열의 바로 뒤, 즉 Asp 서열 뒤에서 펩타이드의 절단을 가져옴 <그림 2-1>.

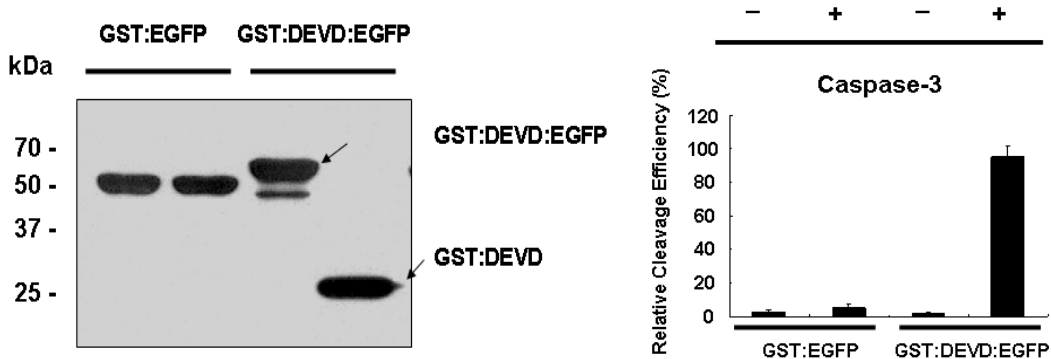
본 연구에서 개발된 형광단백질을 포함하는 혼성단백질은 카스파제 활성화에 의해 변화된 형광을 측정할 수 있게 할 뿐만 아니라, 잘려나간 형광단백질의 감소된 분자량을 측정하는 분석적 접근을 가능하게 해줌 <그림 2-1>.



<그림 2-1> 카스파제-3 활성화 모니터링을 위한 고기능성 리포터 제작

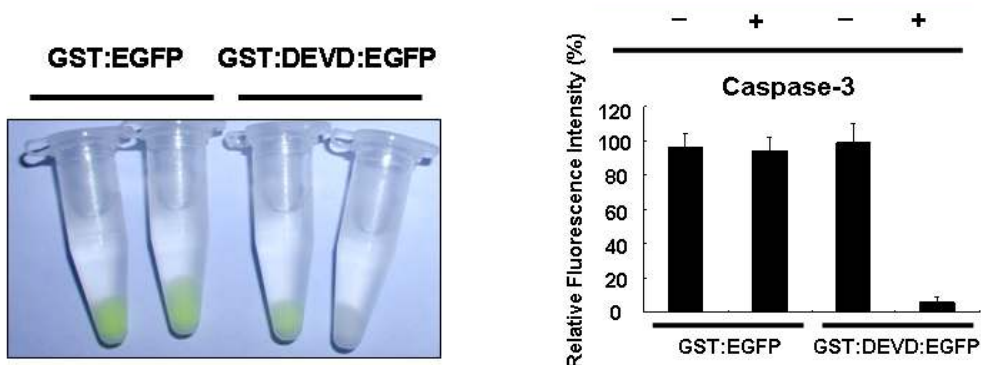
GST:DEVD:EGFP 융합 유전자를 클로닝하기 위하여, EGFP를 코딩하는 전체 길이의 유전자를 서열번호 1의 5' 프라이머와 서열번호 2의 3' 프라이머를 사용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 통하여 증폭하였는데, 5말단과 3말단은 *Bam*HI과 *Eco*RI 제한효소 절단부위를 포함하도록 디자인함.

PCR 산물을 *Bam*HI과 *Eco*RI 제한효소 부위에서 절단한 다음, DNA 단편은 GST 유전자를 포함한 pGEX 4T-1 플라스미드에 도입하여, pGST:DEVD:EGFP의 인 프레임 (in-frame) 융합 카세트를 만들고, GST:DEVD:EGFP 융합 유전자는 DNA 시퀀싱으로 확인함. 재조합 융합단백질의 발현을 위해 pGST:DEVD:EGFP를 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 도입하고, 형질전환된 세포들은 1 mM IPTG로 유도한 다음, 추가적으로 3시간 동안 배양시킨 후, 4°C에서 6,000×g로 10분간 원심분리하여 형질전환 세포를 얻음. 융합단백질인 GST:DEVD:EGFP를 분리하기 위하여, 세포 파쇄액을 GST miniexcellose affinity 컬럼에 로딩하고, 10 ml 균형 버퍼 (PBS, pH 7.4)로 3번 씻어낸 다음, 글루타치온을 이용하여 분리시킴.



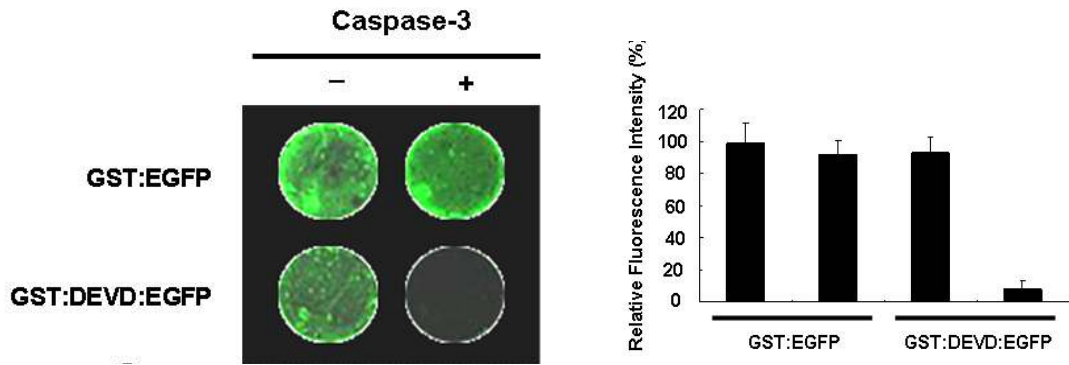
<그림 2-2> 카스파제-3 활성 모니터링을 위한 GST:DEVD:EGFP 리포터의 Western Blotting 분석

분리된 GST:EGFP 융합단백질과 GST:DEVD:EGFP 융합단백질은 SDS-PAGE 상에서 대략 51 kDa 및 52 kDa에 해당하는 것으로 나타났으며, 이는 각 융합단백질의 분자량으로 기대된 것과 일치함 <그림 2-2>. 분리된 융합단백질 GST:EGFP와 GST:DEVD:EGFP는 카스파제-3 분해활성 특성의 *in vitro* 모니터링을 위해 글루타치온-아가로스 비드 분석, SPR 이미징 단백질 칩 기술 및 형광 기반 탐지 방법으로 분석함. 카스파제-3 활성을 비드 체제에서 탐지하기 위해 제조된 GST:DEVD:EGFP 융합단백질을 글루타치온-비드에 고정시켰을 때, GST:DEVD:EGFP와 결합된 비드는 녹색 형광을 띠게 되어 쉽게 인식되는데, 이를 카스파제-3 의존적인 분해활성 모니터링을 위해 사용함 <그림 2-3>.



<그림 2-3> 글루타치온-비드에 고정된 GST:DEVD:EGFP 리포터를 이용한 카스파제-3 활성분석

형광 기반 효소활성 분석을 위해 글루타치온으로 코팅된 유리칩에 상기 GST:DEVD:EGFP 융합 단백질을 고정화시킨 후, 활성 카스파제-3 300 U/ml를 융합단백질인 GST:DEVD:EGFP가 고정된 유리칩에 처리하였으며, 형광 이미지는 GenPix 4200A 488mm laser 및 마이크로어레이 스캐너를 이용하여 측정함 <그림 2-4>.



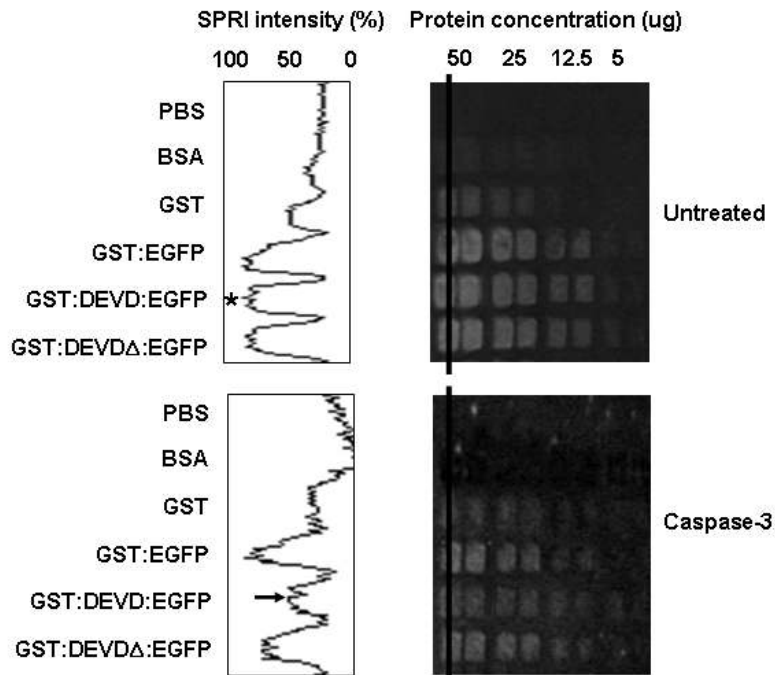
<그림 2-4> 카스파제-3 의존적 GST:DEVD:EGFP 리포터의 형광분석

EGFP 단백질의 분리는 녹색형광이 감소하는 것으로 나타나며, 쉽게 형광판독기를 이용하여 카스파제-3의 분해활성을 측정할 수 있으며, EGFP를 시각화하기 위하여, 녹색 필터가 장착된 형광 현미경으로 유리칩 상의 융합단백질 GST:DEVD:EGFP에 대한 카스파제-3의 분해활성을 측정함. 활성 카스파제-3과 배양하였을 때, 융합단백질 GST:DEVD:EGFP를 고정된 유리 칩의 표면에서는 어떠한 녹색 형광도 감지되지 않았는데, 이는 융합단백질 GST:DEVD:EGFP의 DEVD 부위의 Asp 잔기 뒤에서 분해가 일어나 EGFP 단백질이 유리 칩 위에 고정된 융합단백질 GST:DEVD:EGFP로부터 분리되었음을 의미함 <그림 2-4>.

SPR 이미징 시스템을 이용하여 카스파제-3의 분해활성을 모니터를 위해 GST:DEVD:EGFP 융합단백질이 고정된 골드 칩의 표면에 활성 카스파제-3을 처리하였는데, 이론적으로 EGFP의 사라짐은 GST:DEVD:EGFP 리포터의 분자량에서 대응하는 감소를 가져 오고, 결과적으로 SPR 이미지 신호 정도에 변화를 가져옴.

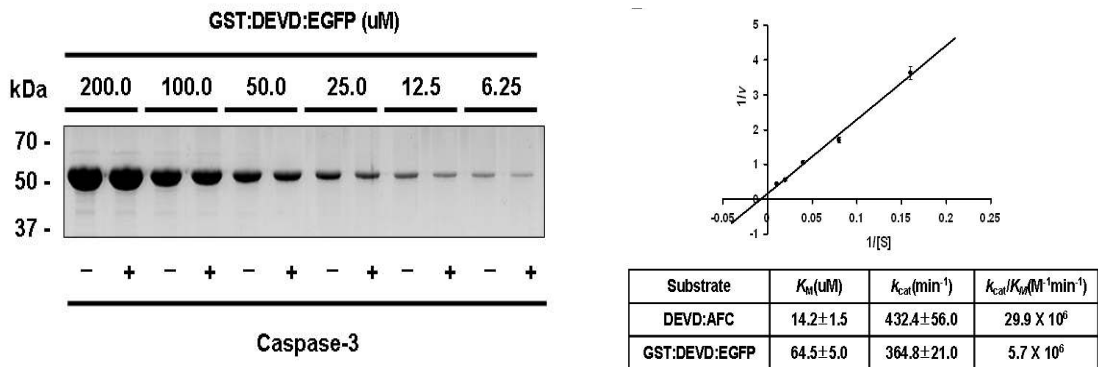
SPR 이미지를 측정한 결과, GST:EGFP에서 골드 표면 위의 SPR 이미지가 더 밝은 것으로 관찰되었고, GST:DEVD:EGFP에서 상대적으로 시각적인 이미지는 실질적으로 흐릿하였는데, 이는 칩의 표면에 고정된 융합단백질 GST:DEVD:EGFP로부터 EGFP가 분리되었음을 나타냄 <그림 2-5>.

GST:DEVD:EGFP의 경우 활성 카스파제-3의 처리시 SPR 시그널의 강도가 상대적으로 약화된 것으로 나타났는데, 이는 카스파제-3의 분해활성으로 융합단백질 GST:DEVD:EGFP에서 EGFP (약 25 kDa)의 분리로 인하여 GST:DEVD (27 kDa)만이 골드칩에 잔존해 있는 것을 의미함 <그림 2-5>.



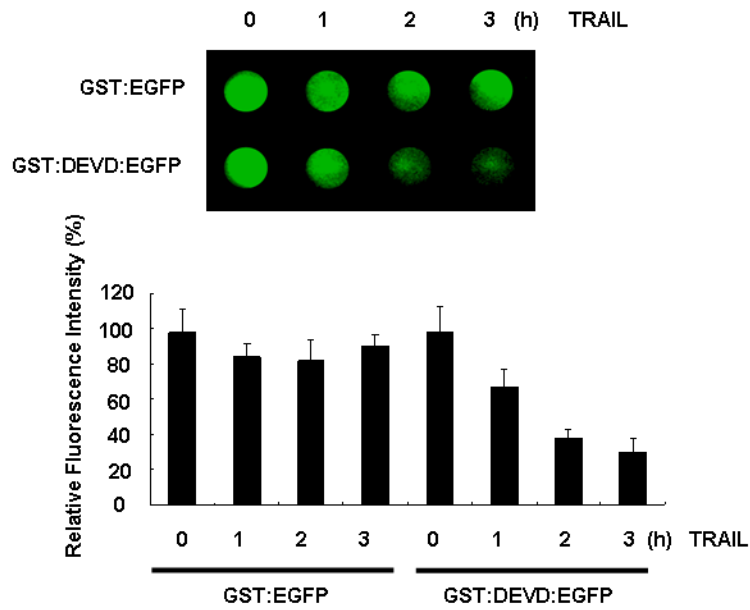
<그림 2-5> SPR 이미징을 이용한 카스파제-3 활성 모니터링

GST:DEVD:EGFP 리포터의 카스파제-3 효소와의 kinetics 분석을 실시하였으며, 리포터 농도 200 ~ 6.25 μM 범위에서 측정함. Kinetics 분석 결과 GST:DEVD:EGFP의 K_{cat}/K_m 값이 5.7×10^6 으로 나타났으며, 카스파제-3의 기질로서 충분히 유용하다는 것을 보여줌 <그림 2-6>.



<그림 2-6> Lineweaver-Burk plot 분석

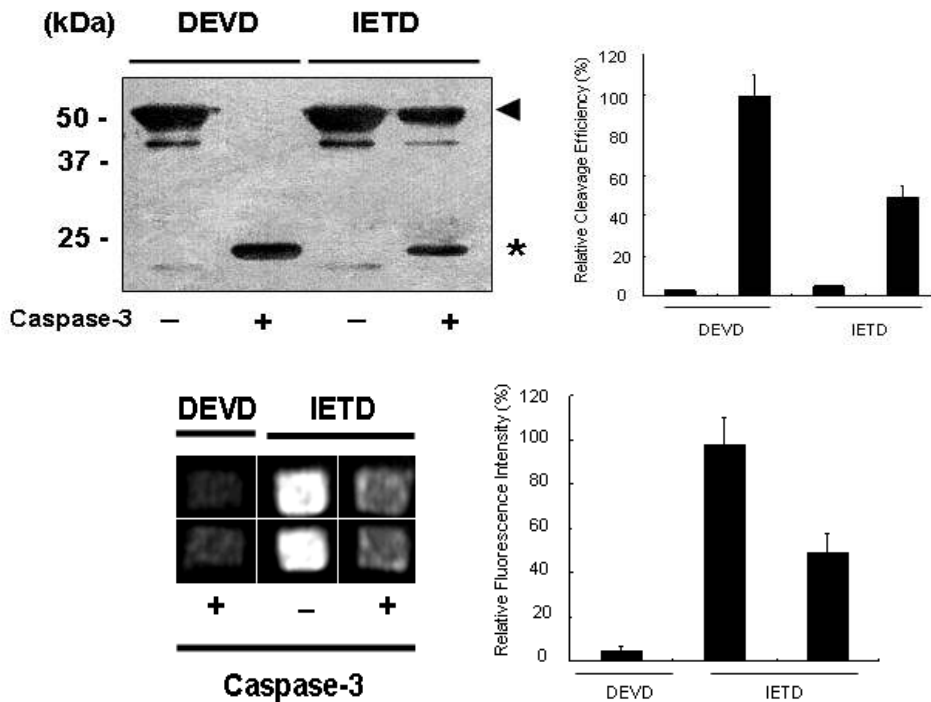
본 연구에서 개발된 GST:DEVD:EGFP 리포터를 이용하여 세포내에 존재하는 카스파제-3의 활성을 *in vivo* 모니터링 하기 위해 HCT116 대장암 세포에 트레일 항암사이토카인을 처리한 세포 파쇄액을 GST:DEVD:EGFP에 처리한 결과, 트레일 처리 시간에 따라 카스파제-3의 활성이 높아지는 것을 확인함으로써 본 리포터가 *in vivo* 모니터링에도 유용하게 사용될 수 있음을 보여줌 <그림 2-7>.

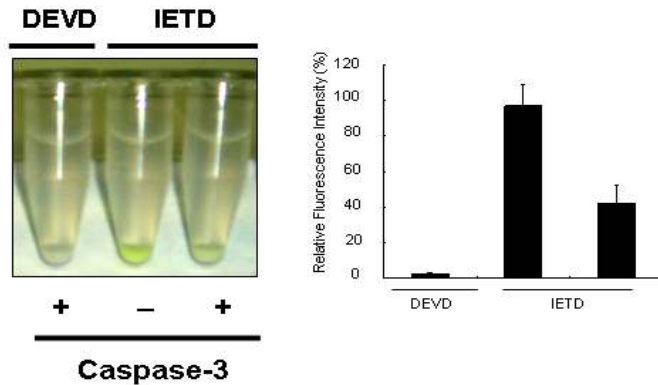


<그림 2-7> GST:DEVD:EGFP 리포터를 이용한 대장암 세포의 카스파제-3 활성 모니터링

나아가서, 카스파제-3 기질 특이성에 대한 검증을 위해 카스파제-8의 기질로 잘 알려져 있는 IETD 아미노산 염기서열을 도입한 GST:IETD:EGFP 리포터를 제작하여 카스파제-3에 대한 특이성을 비교함.

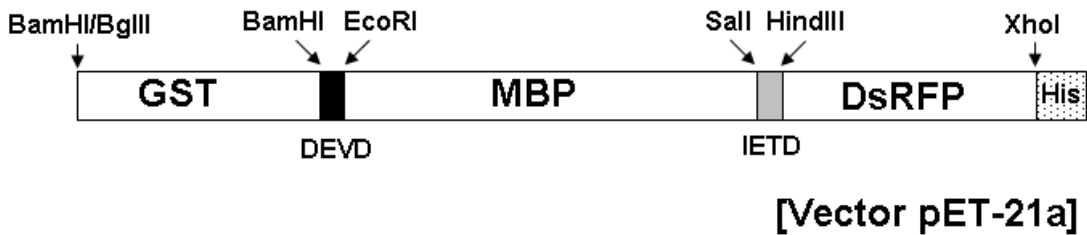
<그림 2-8>에서 보는 것같이 DEVD-리포터에 비교했을 때, IETD-리포터는 약 50% 정도의 반응성을 보였으며, 이는 Western Blotting 분석, SPR 이미징 분석, 형광기반 비드 분석 등으로 검증되었음.



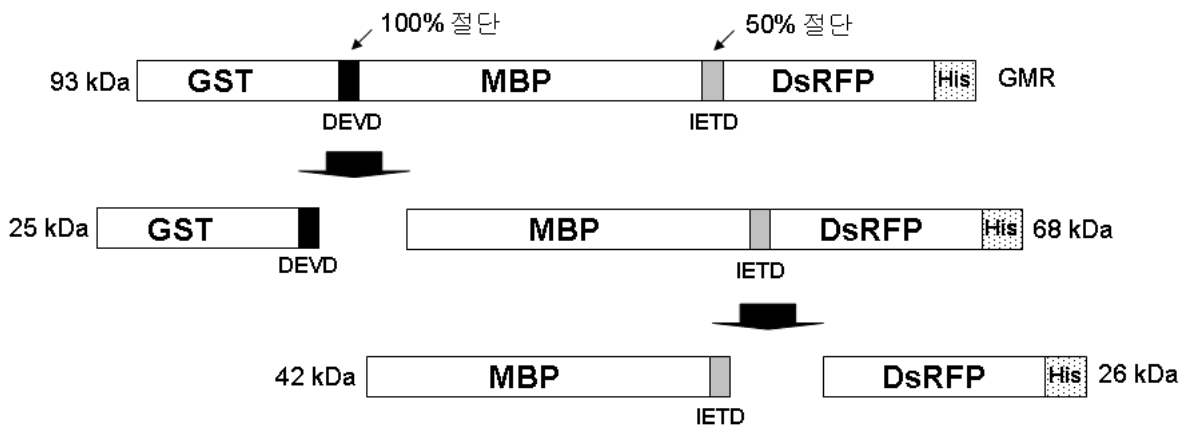


<그림 2-8> DEVD- 및 IETD-리포터 간 카스파제-3 활성 비교 (Western Blotting, SPR 이미징, 형광비드 분석)

본 연구를 통해 확인된 바, 카스파제-3 효소처리에 의한 DEVD-리포터 : IETD-리포터 절단비율이 100%:50% 라는 사실을 바탕으로, DEVD 및 IETD 서열을 pET-21a 벡터에 동시에 도입한 혼성 유전자 카세트를 만들어, 혼성단백질을 분리/정제함으로써 한번에 3종류의 단백질을 만들어 낼 수 있는 단백질 다중생산 시스템을 개발하였음 <그림 2-9, 2-10>.



<그림 2-9> DEVD 및 IETD 모티프가 도입된 MBP-RFP 혼성 형광단백질 모식도

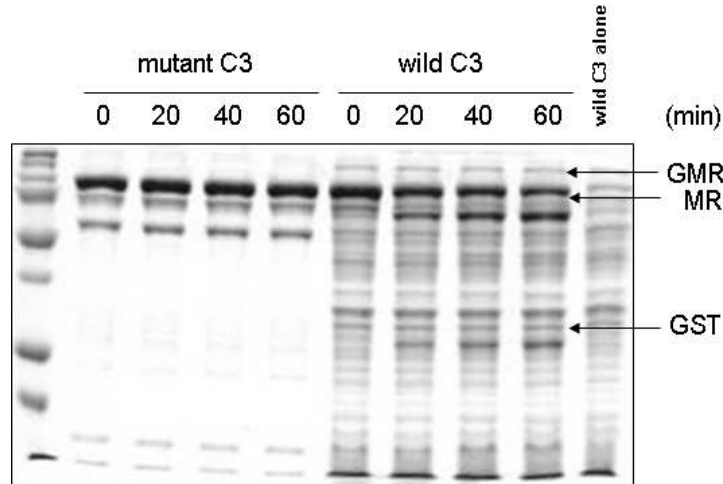


<그림 2-10> DEVD 및 IETD 모티프를 이용한 단백질 다중생산 시스템 모식도

<그림 2-11>에서 보는 바와 같이, mutant 카스파제-3의 경우 절단 부위에서 절단되는 반응을 보이지 않음을 확인하고 wild 카스파제-3를 이용하여 단백질 다중생산 시스템을 구현함.

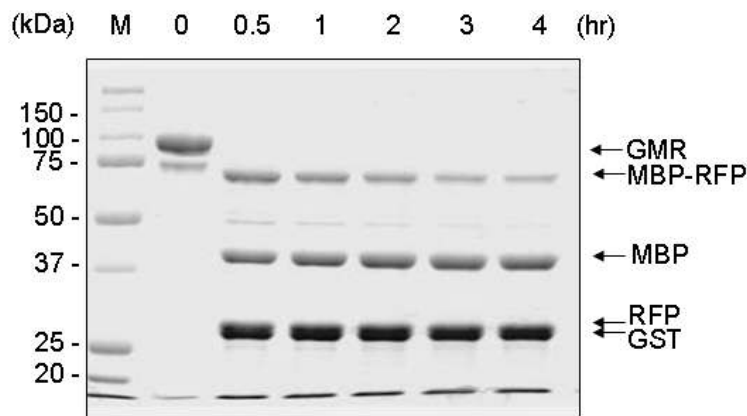
MBP는 pI 값이 6.05, RFP는 pI 값이 4.15로 이온교환 크로마토그래피에서 분리될 것으로 보이나, 첨가된 caspase-3 (pI : 6.01)의 분리가 어려울 것으로 판단됨.

Wild 카스파제-3의 경우 단백질 칩에 사용하던 것으로 정제가 되지 않은 상태였으나, GMR의 경우 mutant 카스파제-3에서와는 다르게 주 밴드 (93 kDa)의 양이 줄어드는 것을 볼 수 있어 mutant 카스파제-3 반응의 문제점이 GMR이 아닌 mutant 카스파제-3에 있음을 확인함 <그림 2-11>.



<그림 2-11> Mutant 카스파제-3 및 wild 카스파제-3를 사용한 기질의 절단 분석 비교

카스파제-3 효소가 DEVD:IETD 모티프를 100%:50% 비율로 절단한다는 본 연구그룹의 결과를 기반으로 단백질 다중생산 시스템이 구현되었으며, GMR (GST:MBP:RFP) 융합 단백질을 카스파제-3로 처리하였을 때, 그림 2-12에서 보는 것과 같이 MBP-RFP, MBP, 그리고 RFP 3종의 단백질이 성공적으로 절단되어 분리되는 것을 확인하였음.



GMR:C3=10:1(ug)

<그림 2-12> 단백질 다중생산 시스템을 이용한 단백질 분리 분석

대장균 내에서 유전자 재조합을 이용한 단백질의 과발현은 종종 insoluble 단백질의 생성을 야기하며 잘못된 folding 과정으로 생성된 불활성 단백질의 응집체로 알려져 있는 inclusion body는 in vitro상에서의 refolding 과정을 통해 분리할 수 있지만 단백질의 생물학적 활성을 보장할 수 없음. 특히 형광단백질들의 경우 insoluble 단백질의 생성이 빈번히 일어남.

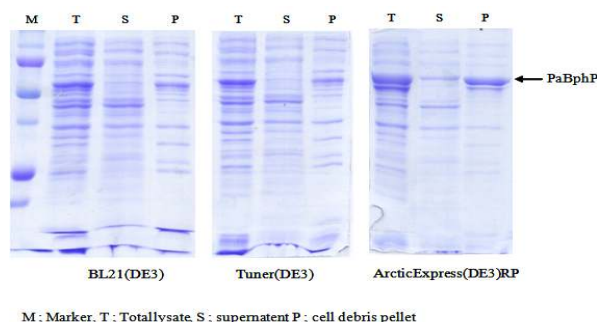
본 연구에서 *Pseudomonas aeruginosa*의 bacterial phytochrome과 그 변이 단백질들은 insoluble 단백질로 발현되어 그 분리와 정제가 어려웠는데 ArcticExpress라는 발현 숙주

를 사용함으로써 대장균에서의 soluble 단백질의 생산을 증가시킬 수 있었음.

Inclusion body의 생성을 막기 위해서는 induction 시간을 조절하거나 inducer의 농도 조절, induction 온도를 낮게 조절과 더불어 chaperonin과 같은 단백질을 함께 발현시킬 수가 있고 대장균의 chaperonin은 unfolding 되었거나 부분적으로 folding된 단백질을 감싸 단백질의 적절한 folding을 가능하게 하고 안정화시킴. 그러나 대장균이 가지고 있는 GroEL/ES라는 chaperonin 복합체는 온도를 낮추면 refoldig을 할 수 있는 능력이 30% 밖에 남아 있지 않아, 온도를 낮춰 induction을 하는 데 함께 사용하기에는 한계가 있고 이러한 장애를 극복하기 위해 ArcticExpress는 낮은 온도에서도 향상된 chaperonin 단백질 생산 과정을 위해 조작되어짐. ArcticExpress가 가지고 있는 Cpn10과 Cpn60 chaperonin들은 저온성 세균인 *Oleispira antarctica*로부터 획득한 cold-adapted chaperonin으로써 대장균의 GroEL과 GroES에 대해 각각 74%와 54%의 상동성을 가지고 있으며, 4-12 °C에서 단백질의 높은 refolding 활성을 보임.

*P. aeruginosa*의 bacterial phytochrome은 PCR 기법을 통해 genomic DNA로부터 증폭하여 pET28a에 삽입하여 제작 하였으며, ArcticExpress(DE3)RP의 형질 전환한 뒤, 최종 50 µg/ml kanamycin과 20 µg/µg gentamycin이 들어 있는 배양 배지에 도말했음. 형질 전환된 단일 콜로니를 최종 50 µg/ml kanamycin과 20 µg/µg gentamycin이 들어 있는 액체 배지에 넣고 배양하고 다음 날 최종 20 µg/µg gentamycin이 포함된 액체 배지에 seed를 접종한 뒤 30 °C에서 200 rpm의 교반과 함께 3시간 동안 배양, 12 °C 온도에 맞춰 준비해 놓은 다른 배양기로 옮겨 10분 정도 방치하여 배양액의 온도가 낮아지면 최종 1 mM IPTG를 넣은 뒤 200 rpm의 교반과 함께 하룻밤 배양함.

<그림 2-13>은 세가지의 다른 대장균 균주에서 bacterial phytochrome을 발현정도와 soluble한 단백질의 발현양을 보여주고 있으며, Arctic 균주를 이용하여 저온에서의 형광 단백질 발현의 경우 더 많은 양의 단백질이 발현 될 뿐 아니라 일부 발현된 단백질이 soluble한 형태로 발현됨을 볼 수 있었음. 그에 반하여 재조합 단백질 발현에 가장 많이 쓰이는 대장균주인 BL21(DE3)의 경우는 거의 대부분의 발현된 phytochrome 단백질이 insoluble형태로 존재함을 볼 수 있음. 이러한 저온 재조합 단백질 발현 시스템은 folding이 어려운 다양한 단백질의 soluble한 발현 정제에 많은 도움을 줄 것으로 생각됨.



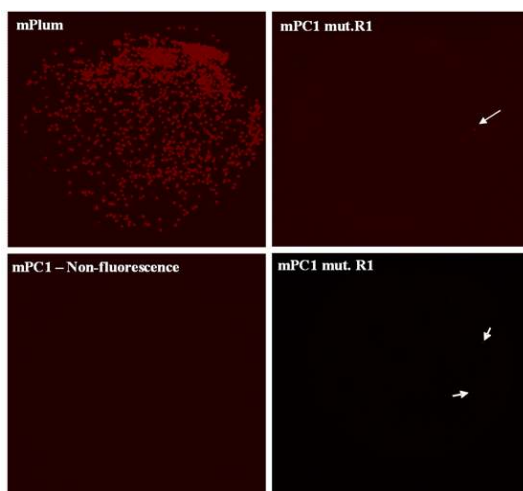
<그림 2-13> phytochrome 발현 test

본 연구에서는 또 다른 단백질 발현 시스템으로 형광 단백질의 유전자 cloning과 이들의 발현을 동시에 관찰하고 이를 이용한 형광단백질 스크리닝 시스템을 개발 향후 분자 진화기법을 이용한 이들의 개량 방법을 확립하였음.

pBAD 발현 시스템은 다른 세균의 발현 시스템과 대장균 내에서 단백질 최대 생산을 위한 간단한 방법 중 하나이며 대장균의 arabinose 오페론 조절 작용이 사용된 pBAD vector는 araBAD promoter가 발현을 팽팽히 조절해 주며 유전자 재조합 단백질의 최고 생산을 위한 이상적인 조건의 조절을 가능하게 함. 이러한 pBAD를 이용한 재조합 단백질의 발현을 위해 두가지 대장균을 tlga 하였음. TOP10은 L-arabinose의 운반은 가능하지만 대사

작용에는 사용할 수 없어 L-arabinose를 유도체로 사용하는 pBAD 발현 시스템에서 유전자 재조합 단백질의 발현이 용이한 숙주 중 하나이며 *recA*, *endA* gene을 가지고 있어 cloning과 발현 모두에 용이하다. LMG194는 영양 요구성 균주로 최소 배지에서 배양되면서 glucose라는 유일한 탄소원이 pBAD의 promoter를 억제시켜 유도체가 들어가기 전까지의 유전자 재조합 단백질의 basal level을 줄여주며 또한 cloning과 발현 모두에 사용 가능함.

형광 단백질 중 하나인 mPlum의 circular permutation을 통해 mPC1이라는 새로운 유전자를 구축하여 pET28a vector에 삽입하고 GeneMorph II Random mutagenesis kit (Stratagene)를 이용한 error-prone PCR 생산물은 mPlum 변이체 library를 구축하였음. Electroporator를 이용하여 LMG 194 electro-competent cell에 전기 충격을 가해 변이 유전자들이 삽입되도록 했으며 최종 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilline과 0.2% L-arabinose가 들어 있는 배양 배지에 500~600개의 콜로니가 되도록 도말하였음. 37°C에서 하룻밤 배양한 플레이트들은 상온에 두고 보관하면서 관찰하여 pBAD를 이용한 형광 단백질의 발현으로 L-arabinose가 있는 배지에서 자란 콜로니들은 눈으로 색깔 변화의 확인이 가능했고, LAS 3000을 이용한 콜로니의 형광 관찰로 형광 단백질 변이주의 screening 방법을 확립하였음 <그림 2-14>.



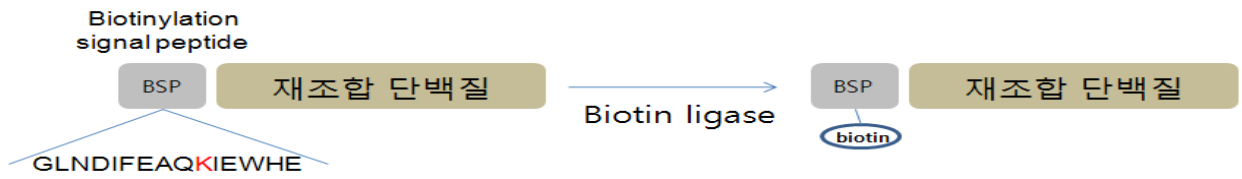
<그림 2-14> 분자진화 기법을 이용한 mPlum 단백질의 발현 및 스크리닝 시스템

바이오틴(biotin)과 avidin 변형체들간의 결합은 자연계에 존재하는 비공유결합 중 가장 강하여 생물공학에서부터 융합연구에 이르기까지 많은 분야에서 사용되고 있으며 이러한 바이오틴을 생체물질에 중합시키는 많은 방법들이 알려져 있음. 이러한 바이오틴 중합방법은 대부분 화학적 공유결합을 통하여 이루어지고 있으며 이러한 방법의 경우 타겟 생체물질에 Lysine아미노산을 목표로 하여 무작위로 중합시키는 방법이 보편적으로 사용되고 있음.

본 연구에서는 단백질에 특이적인 부분에만 하나의 바이오틴을 중합시킬 수 있는 대장균 시스템을 이용하여 위의 PZA단백질등 다양한 단백질에 특이적으로 바이오틴이 중합된 재조합 단백질들을 발현 확보하였음.

<그림 2-15>은 대장균내 발현된 재조합 단백질에 특이적 바이오틴 중합반응을 보여줌. 15개의 아미노산으로 이루어진 biotinylation signal peptide중 lysine side chain에 바이오틴이 특이적으로 중합하게 되며 이는 대장균내 이미 발현되고 있는 biotin ligase를 통해서 이루어지게 됨. 이러한 바이오틴 중합 반응은 ATP와 바이오틴이 필요하며 대장균의 단백질 발현을 위한 배양에서 배지에 추가로 바이오틴을 첨가하여 중합 재조합 단백질을 얻을 수 있음.

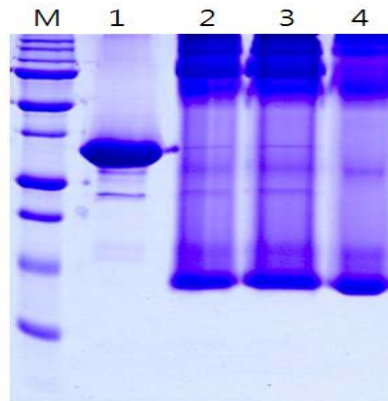
특이적 바이오틴 중합 단백질의 예로 위에서 제작된 PAZ-dsRBD단백질에 특이적으로 바이오틴을 중합시킨 재조합 단백질을 생산하였고 이러한 단백질은 항우 마이크로 RNA 센서로 사용될수 있고 바이오칩을 이용한 마이크로 RNA의 프로파일링 실험을 진행 중에 있음.



<그림 2-15> 특이적 바이오틴 중합 재조합 단백질 발현 시스템 확보

바이오틴 중합 재조합 단백질의 발현은 AVB101 균주를 사용하였으며, 본 균주는 pACYC184 플라스미드 벡터를 포함하고 있어 IPTG 발현에 따라 E coli biotin ligase를 발현하고 이를 이용하여 바이오틴 중합 반응이 일어난다.

본 연구에서는 위의 pET28a에 클로닝 되어있는 PAZ-dsRBD 단백질에 N 말단 부분에 biotinylation signal peptide를 삽입하고, AVB101 균주에서 50 uM의 바이오틴이 배지에 포함된 상태로 재조합 단백질을 발현 정제하였음. <그림 2-16>는 정제된 biotin-PAZ-dsRBD 단백질을 보여주고 있으며, 바이오틴의 효율적인 중합을 알아보기 위하여 neutral avidin을 가하여 SDS-PAGE 방법으로 관찰하였음. 바이오틴-neutral avidin 사이의 결합은 매우 강하여 샘플에 열을 가하지 않고 SDS-PAGE로 분리를 할 경우 그 결합을 유지할 수 있음.



M: size marker
1: biotin-PAZII-eIF2C1- *Aquifex aeolicus* RNase III (Aa-RNase III)- dsRBD
2: biotin-PAZII-eIF2C1- *Aquifex aeolicus* RNase III (Aa-RNase III)- dsRBD + Neutral avidin
3: biotin-PAZII-eIF2C1- *Aquifex aeolicus* RNase III (Aa-RNase III)- dsRBD + Neutral avidin
4: Neutral avidin

<그림 2-16> biotin-PAZ-dsRBD 발현 정제와 neutral avidin과의 결합

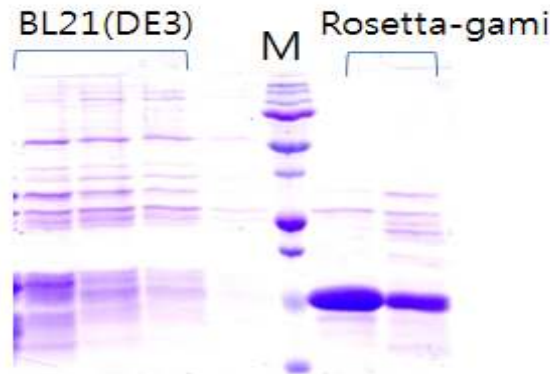
이와 같은 발현 시스템에서 제작된 바이오틴 재조합 단백질의 경우 거의 대부분의 단백질이 바이오틴을 포함하고 있는 것을 볼 수 있고 중합된 바이오틴은 avidin 변이체들과 강한 결합을 유지하고 있는 것을 확인하였음.

본 연구에서는 또한 발현과 folding이 어려운 avidin 변형체중에 하나인 rhizavidin의 발현 정제 시스템을 확립하였음. 본 단백질의 경우 다른 avidin 변형체들과 달리 dimer를 형성하고 있고 cDNA상에 많은 E coli rare codon을 포함하고 있으며 또한 각각의 monomer가 disulfide bond를 형성하여 단백질의 바이오틴과 결합하는 성질에 중요한 역할을 차지하고 있는 것으로 알려져있음.

이러한 rare codon의 존재와 disulfide bond를 포함하고 있는 단백질의 효율적인 발현을 위하여 본 연구에서는 Rosetta-gami 대장균주를 확보하여 발현에 성공하였음. 본 균주는 7개의 E coli rare codon tRNA (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, CGG)) 를 포함하고 있어 이들 rare codon을 상당수 포함하고 있는 rhizavidin의 발현에 효율을 높일수 있었음. 또한 rosetta-gami는 K-12 균주에 thioredoxin reductase와 glutathione reductase 두개의 유전자에 변이를 포함하고 있어 이러한 균주내에서 재조합 단백질들의 disulfide bond의 형성을 촉진 시키게 됨.

<그림 2-17>에서 볼 수 있듯, BL21(DE3)에서 발현물이 현저히 떨어지는 rhizavidin

의 경우에도 rosetta-gami에서 그 발현률이 높아질뿐만 아니라 발현된 재조합 단백질의 바오틴 결합 반응성도 유지하는 것을 관찰하였음.



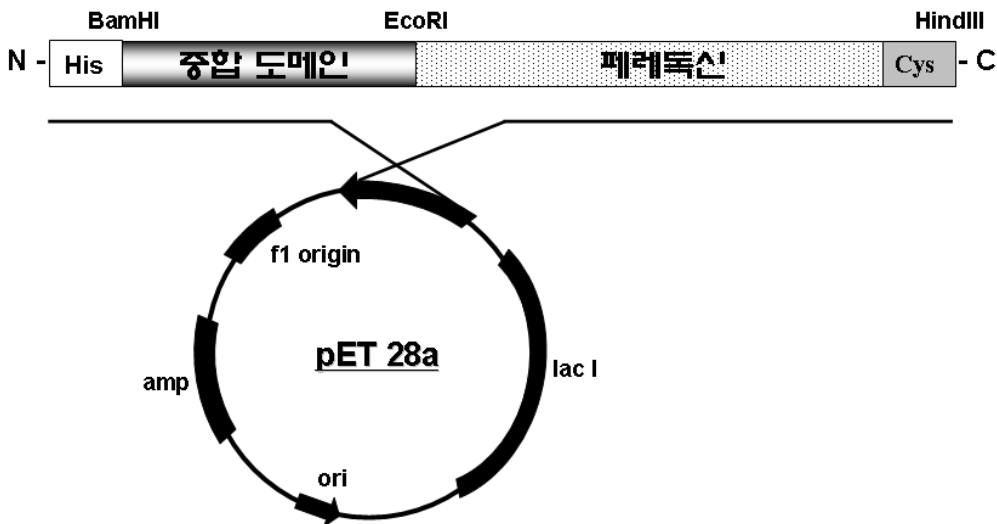
<그림 2-17> BL21(DE3)와 Rosetta-gami 균주를 이용한 avidin 변형체 발현

3. 생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술 개발

생물전자소자용 단백질로서 생체분자 고효율 고정화를 위해 중합 도메인이 삽입된 재조합 단백질 제작 기술을 통해, 센서표면 고정화용 단백질의 중합체 형성을 조절함으로써 전자소자 표면 부착능력 및 표면 밀도 개선을 위한 바이오 인터페이싱 기술을 개발함.

단백질의 중합체 형성은 주로 짧은 Coiled-Coil Motif (CCM)에 의해 유도되며, CCM은 첫 번째와 네 번째 아미노산에 소수성 잔기로 이루어진 7개 아미노산의 반복구조로 구성됨.

Coiled-Coil Motif (CCM)로서 가장 잘 알려져 있는 효모의 전사조절인자인 GCN4 루이신-지퍼 이중합체 도메인을 선발하였으며, 이것을 주형으로서 사용기 위해 aga atg aaa caa ctt gaa gac aag gtt gaa gaa ttg ctt tcg aaa aat tat cac ttg gaa aat gag gtt gcc aga tta aag aaa tta gtt ggc gaa cgc (폴리펩타이드: RMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER) 올리고머를 합성하였고, 합성된 올리고머는 각각 BamHI 및 EcoRI 제한효소에 인지될 수 있도록 설계하여 pET-28a 벡터에 페레독신 단백질과 함께 클로닝 함 <그림 3-1>.



<그림 3-1> 중합 도메인이 포함된 페레독신 산화환원 단백질의 디자인 모식도

GCN4 루이신-지퍼 이중합체 도메인의 7개 아미노산의 첫 번째 또는 네 번째 아미노산 잔기를 각각 PCR-기반 점 돌연변이 기법을 이용하여 변이체를 디자인 하였으며, 삼중합체 (Trimer (GCN4-pII)) 및 사중합체 (Tetramer (GCN4-pLI)) 도메인을 제작한 후, 시퀀싱을 통해 돌연변이 염기서열을 확인함 <그림 3-2>.

1. [Dimer (GCN4-pI)]

aga atg aaa caa ctt gaa gac aag gtt gaa gaa ttg ctt tcg aaa aat tat cac ttg gaa aat gag gtt gcc aga tta aag aaa tta gtt ggc gaa cgc (RMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER)

2. [Trimer (GCN4-pII)]

aga atg aaa caa att gaa gac aag att gaa gaa atc ctt tcg aaa att tat cac atc gaa aat gag att gcc aga att aag aaa tta att ggc gaa cgc (RMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGER)

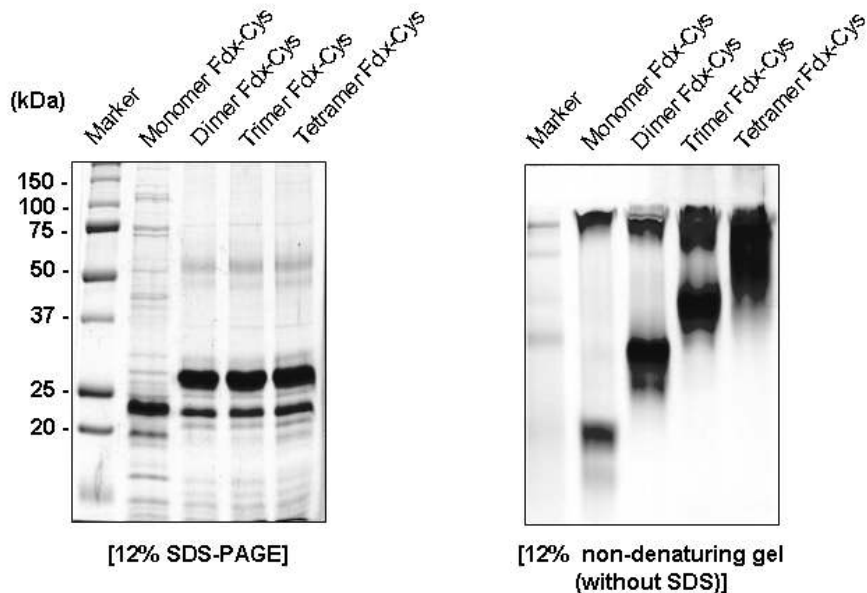
3. [Tetramer (GCN4-pLI)]

aga atg aaa caa att gaa gac aag cta gaa gaa atc ctt tcg aaa tta tat cac atc gaa aat gag ctt gcc aga att aag aaa tta ctt ggc gaa cgc (RMKQIEDKLEEILSKLYHIENELARIKLLGER)

<그림 3-2> GCN4 루이신-지퍼 중합 도메인 돌연변이에 의한 multimer 도메인 제작

유전자 재조합 기술의 발전으로 유전자의 조작 및 단백질의 조작이 가능하며, 단백질을 구성하는 아미노산 잔기의 치환, 삭제, 삽입 등 아미노산 서열의 재설계를 통해 구조와 기능에 변화를 줄 수 있는 신기능 하이브리드 단백질을 개발할 수 있음.

페레독신 산화환원 단백질의 표면고정화 효율 및 표면 밀도를 높이기 위해, 도메인 삽입 기법을 사용하여 단량체, 이중합체, 삼중합체, 사중합체 4종의 전자소자용 단백질을 개발하였으며, 발굴된 4종의 단백질은 Native gel을 통해 분자량에 따라 분리됨을 확인함으로써, 성공적으로 multimer 페레독신 단백질이 만들어졌음을 검증함 <그림 3-3>.



<그림 3-3> Multimer 도메인 삽입에 의한 중합체 페레독신의 분리 (Native gel 분석)

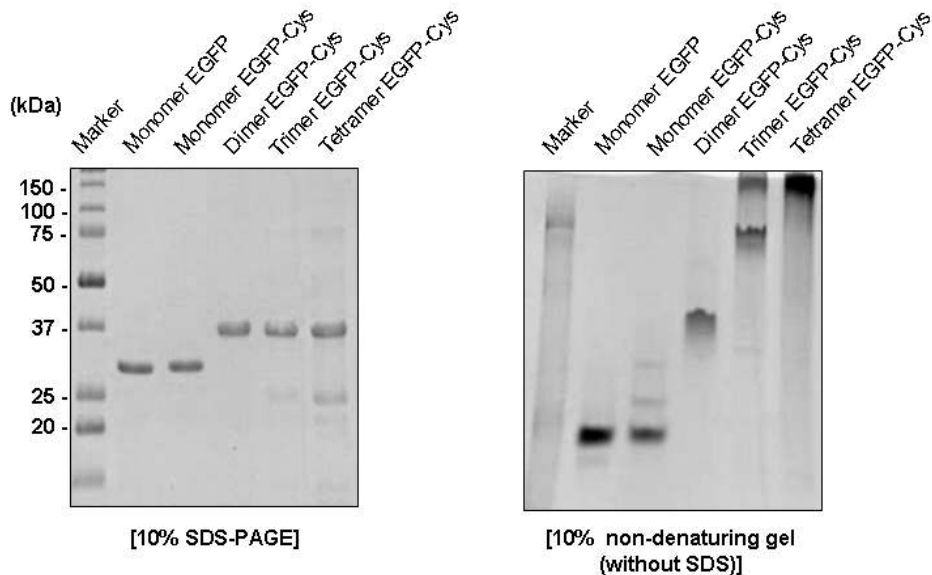
본 연구에서 구축된 단백질의 다중합 기술을 형광단백질 (EGFP, enhanced green fluorescent protein)에 적용하여 multimer 형광단백질을 제작하였으며, 이를 이용하여 다중합체 전자소자 단백질의 표면 고정화 효율의 형광분석 및 mass 기반 분석이 가능함 <그림 3-4>.



<그림 3-4> 이중합체, 삼중합체, 사중합체 EGFP 제작 모식도

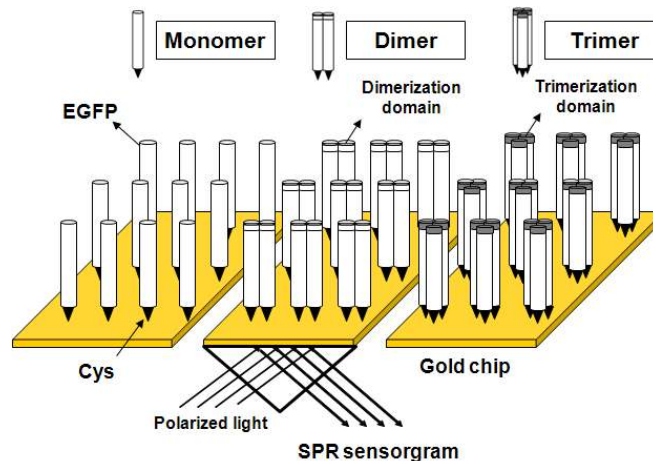
다중합체 형광단백질 분석을 위해 10% SDS-PAGE, 일반적인 샘플 로딩 버퍼를 사용하였으며 각각 10ug 단백질을 로딩함. 또한, native gel 분석을 위해 10% non-denaturing gel (without SDS) 및 mercaptoethanol이 없는 샘플 로딩 버퍼를 사용함 <그림 3-5>.

그림 3-5에서 보는 것같이 EGFP 형광단백질의 중합체가 성공적으로 제작되었음을 확인하였으며, 특히 사중합체 EGFP는 정제시에 단백질의 엉킴이 심한 것을 관찰하였음.



<그림 3-5> 중합 도메인 삽입에 의한 multimer 형광단백질의 분리 (Native gel 분석)

현재 단량체, 이중합체, 삼중합체, 사중합체 EGFP-cys 재조합 단백질이 발현/정제 완료되었으며, multimer를 이용한 SPR 실험 및 형광분석을 통해 생체분자의 고효율 고정화 및 표면 안정성 테스트가 진행하였음 <그림 3-6>.

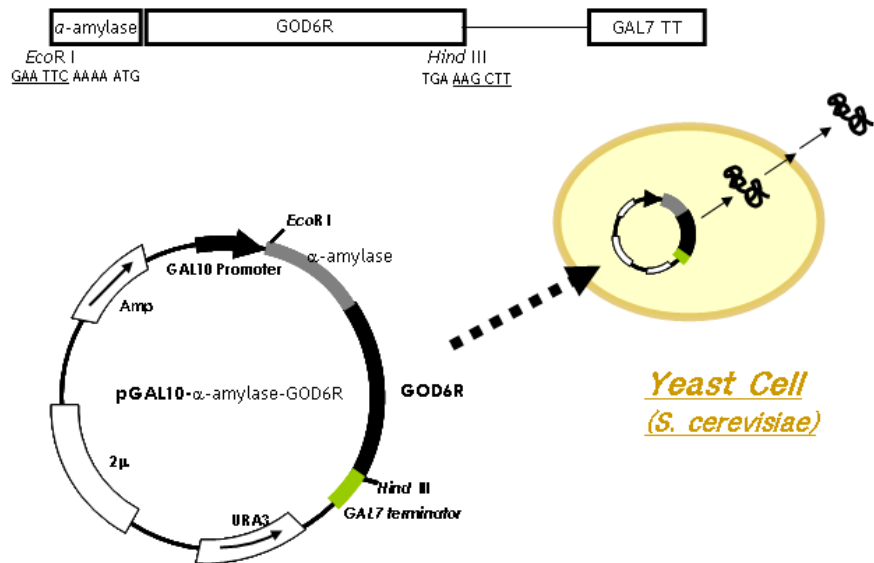


<그림 3-6> multimeric EGFP단백질의 표면 고정화 분석

이들 단백질의 골드 표면에서의 고정화 정도를 살펴보면 삼중합체의 EGFP의 경우 가장 높은 밀도의 단백질 고정화를 보여주었음.

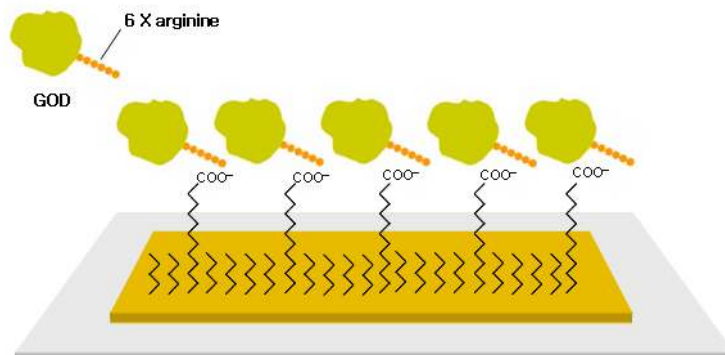
전자소자용 효소의 표면 밀도개선을 위해 유전공학적인 방법을 이용하여 효소 변이체를 생산하였는데, 6개의 알기닌이 태그된 글루코즈옥시다제를 코딩하는 유전자를 발현 벡터에 삽입하고, 상기 발현벡터를 효모에서 발현시키는 방법을 통해 제조하였음.

알기닌이 태그된 글루코즈 옥시다제 단백질의 분리 및 정제를 용이하게 하기 위하여 글루코즈옥시다제를 코딩하는 유전자의 N-말단에 아스퍼질러스 나이거의 알파-아밀레이즈 시그널 서열을 결합시켜 생성된 재조합 단백질이 효모 세포 밖으로 분비되도록 함 <그림 3-7>.



<그림 3-7> 알기닌이 태그된 글루코즈옥시다제 변형체의 유전자 제작

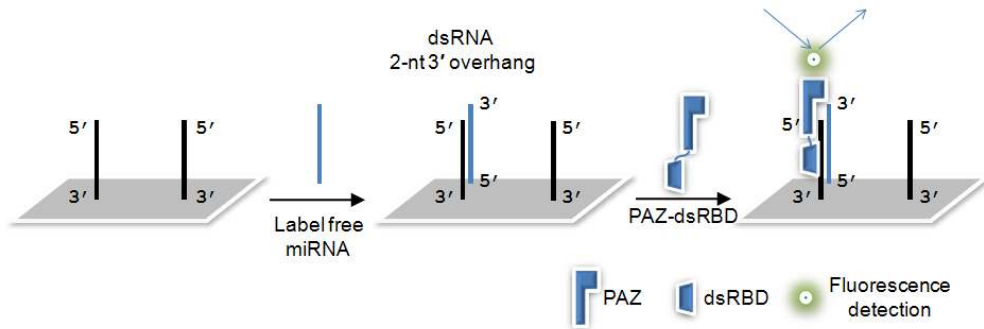
N-말단에는 α-amylase 시그널 서열이 연결되고, C-말단에는 6개의 알기닌이 태그된 글루코즈옥시다제 변형체를 코딩하는 유전자가 연결된 유전자 단편을 상기한 pGAL10 벡터에 삽입하여 제작한 발현 벡터 pGAL10-α-amylase-GOD-6R를 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에 형질전환 시켜 알기닌이 태그된 글루코즈옥시다제를 생산함. 말단에 카르복실기 (-COOH)를 작용기로서 포함하는 화합물로는 11-머캅토 운데카노산 (11-Mercapto undecanoic acid)을 사용하여, GOD6R 효소변이체가 표면에 단분자층을 형성하며 고정화되도록 함 <그림 3-7>.



<그림 3-7> 자기조립단분자막 형성과 효소 고정화

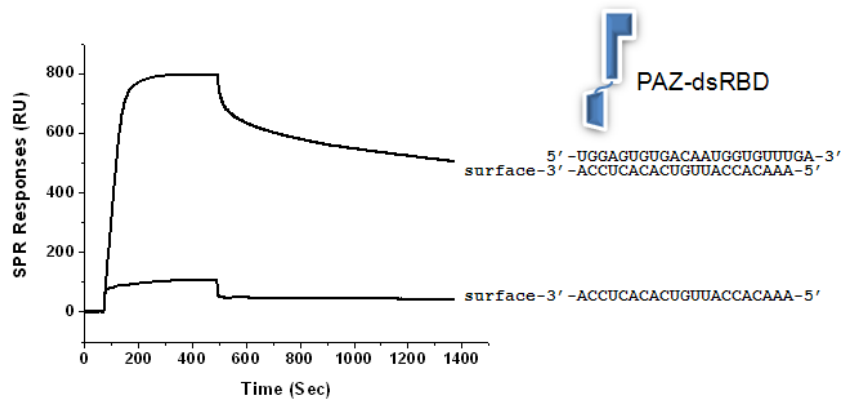
본 연구에서는 또한 생체분자의 전기화학적 분석을 위하여 개량이 용이한 생체분자 프로브를 개발하였음. 전기화학적 신호를 전달하는 진단용 전자소자의 개발을 위하여 항체 이외에 다른 프로브가 필수적임. 본 연구에서는 마이크로 RNA를 결합하는 프로브 개발을 통하여 생체분자의 전기화학적 분석을 위한 생물전자소자 프로브를 개발하였음.

마이크로 RNA(microRNAs, miRNAs)는 바이러스, 식물 및 동물에서 유전자 발현을 조절하는 작은 비-암호화되는 RNA의 종류로써(19~25 뉴클레오타이드), 이들은 DNA에 의해 암호화된다. 이들은 계놈으로부터 전사 후, 단편으로 잘라져서 특정 단백질의 생성을 증가시키거나 감소시키는 역할을 한다. 현재까지 포유류에서 알려진 마이크로RNA의 기능은 인슐린 분비 조절, 임파구 분화 조절, 세포분열 조절, 세포사멸 조절, 바이러스 복제 조절 등이다. 최근에는 암을 비롯한 질병과 마이크로RNA의 관련성이 드러나면서 학계뿐만 아니라 산업계의 관심이 쏠리고 있다. 본 연구에서는 이러한 기존의 어려운 마이크로 RNA의 검출방법에서 벗어나 효소적 표지과정 또는 증폭반응 없이 보다 간단하게 구조-특이적인 RNA 결합 단백질을 이용하여 마이크로RNA를 탐지하는 무표지 마이크로 RNA 검출방법을 고안하여 본 발명을 완성하였다 <그림 3-8>.



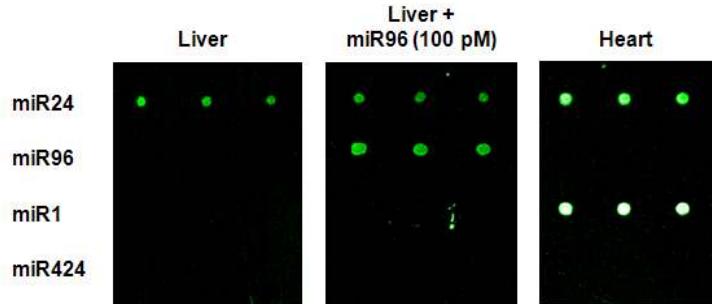
<그림 3-8> 마이크로 RNA 결합 프로브를 이용한 분석법 개발

그림 <1-10>과 <1-11>에서 발현한 PAZ 도메인과 dsRBD도메인을 이용하여 RNA구조 특이적 결합 단백질 프로브를 제작하였음. 이러한 PAZ-dsRBD단백질 프로브는 표면에 결합된 마이크로 RNA의 구조에 특이적으로 결합하는 것을 SPR분석법을 통하여 관찰 하였음. <그림 3-9>에서 관찰 할 수 있듯이 표면에 있는 단일가닥 RNA에 비해서 마이크로 RNA가 결합된 경우에 특이적 결합을 관찰하였음.



<그림 3-9> SPR분석을 통한 PAZ-dsRBD 프로브의 마이크로 RNA 결합 특이성 확인

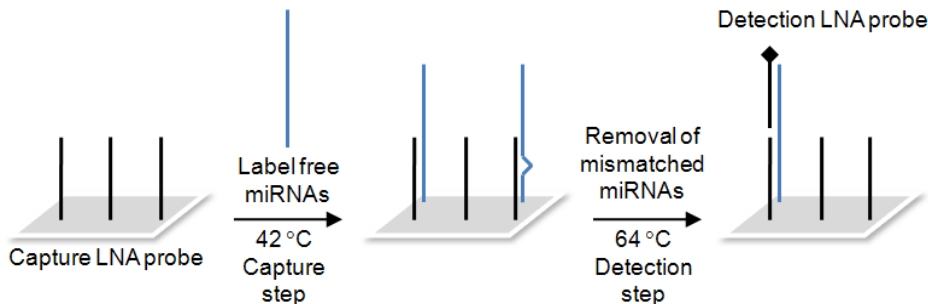
이러한 마이크로 RNA 특이적 단백질 프로브를 이용하여 실제 Liver와 Heart 샘플에 있는 마이크로 RNA를 분석하였으며 <그림 3-10>에서 나타나듯이 효율적으로 타겟 마이크로 RNA를 분석하였음.



<그림 3-10> 마이크로 RNA 특이적 단백질 프로브를 이용한 샘플 분석

본 연구에서는 또한 Locked Nucleic Acid (LNA)를 포함하고 있는 DNA probe를 이용하여 마이크로 RNA를 효율적으로 분석하는 전략을 개발 하였으며 이러한 DNA probe와 상기 단백질 프로브에 전기신호 전달물질의 중합을 통하여 새로운 진단용 바이오전자소자를 개발 할 수 있게 됨.

<그림 3-11>은 LNA를 포함한 DNA 프로브를 이용한 마이크로 RNA 분석 방법을 보여줌. Detection LNA 프로브에 전기신호 전달 물질인 ferrocene을 중합한 시스템은 마이크로 RNA의 효율적인 전기화학 분석법을 제시하고 있음.



<그림 3-11> LNA를 포함한 DNA 프로브를 이용한 마이크로 RNA 분석

4. FET 센서 기반 생체분석 시스템 개발

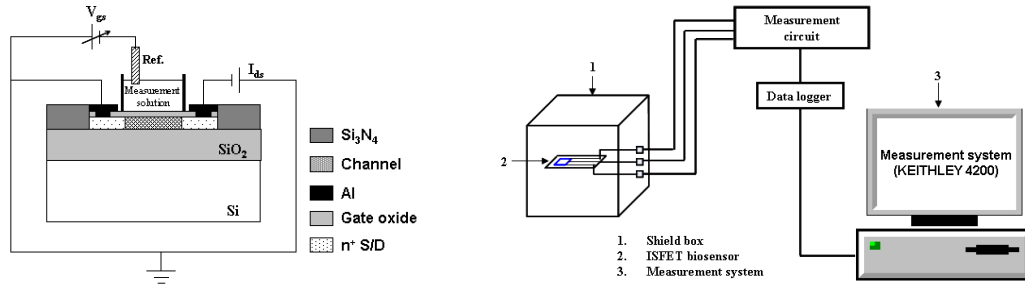
본 연구를 통해 n-type ISFET 바이오센서를 제작하였으며, 구현된 ISFET 바이오센서를 이용하여 말토오스 결합에 의해 유발되는 말토오스 결합 단백질의 3차원 구조변화를 전계효과 트랜지스터 방식을 통해 측정하였음.

FET 원리를 이용한 FET형 센서 중에서 가장 대표적인 것이 ISFET (ion sensitive field-effect transistor)이며, 이는 ISE (ion selective electrode)와 MOSFET를 교묘하게 결합시킨 반도체 마이크로센서로서 종래의 ISE에 비하여 월등한 장점 (빠른 반응, 초소형 초경량, in-vivo 및 in-situ 측정가능, 단일칩 스마트화 등)을 가지고 있음.

ISFET 바이오센서는 ISFET과 생체 기능성막을 결합한 소자로서 집적회로 공정기술을 활용하여 제조되므로, 소형화, 규격화 및 양산화가 가능할 뿐만 아니라 신호처리 회로를 함께 집적시킨 스마트센서 제조에 매우 유리함.

<그림 4-1>는 n-type ISFET 바이오센서의 구성 및 측정 시스템 모식도를 나타내며

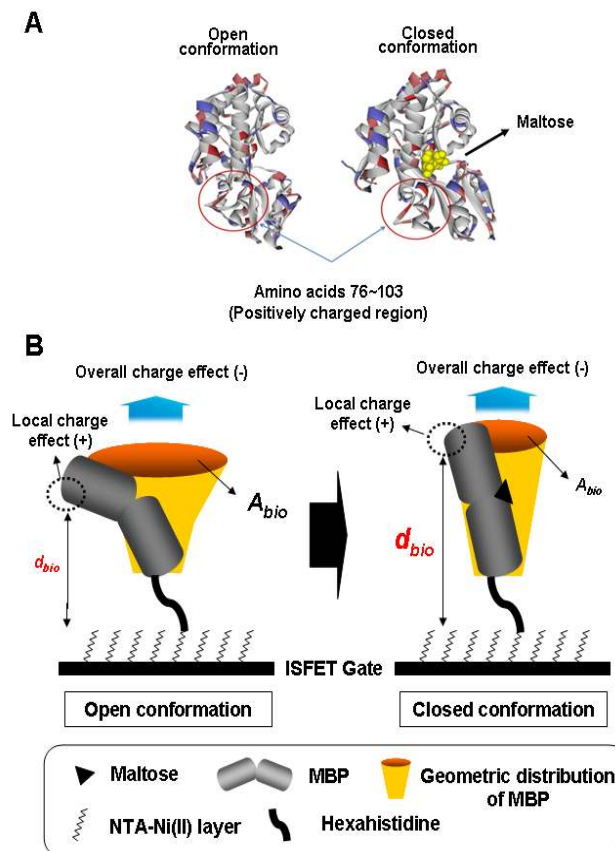
전류-전압 특성이 반도체 표면에 생체분자의 부착에 의하여 표면 전위가 변하는 원리를 이용한 전하-의존성 축전용량 기반 모니터링 시스템 (charge-dependent capacitance measurement system) 임.



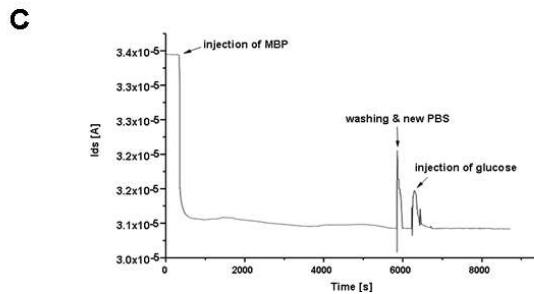
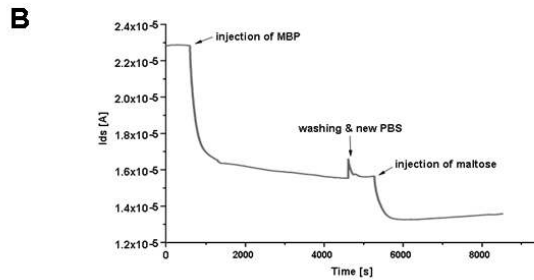
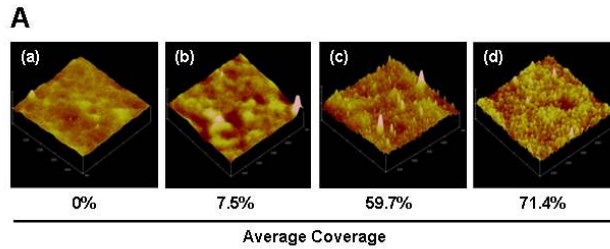
<그림 4-1> 단백질 구조변화 측정용 ISFET 바이오센서의 측면도 및 측정시스템 모식도

MBP는 370개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량이 약 40 kDa, 그리고 크기가 $3 \times 4 \times 6.6$ nm에 달하는 단백질로, 말토오스의 결합에 의해 구조적인 변화를 일으키는데, 구조의 변화는 0.7 nm 움짐임, 35도 회전, 8도 꼬임 현상을 동반함 <그림 4-2>.

<그림 4-2>는 ISFET 바이오센서를 이용한 MBP 구조변화 모니터링 모식도를 보여주는 그림이며, 본 연구에서는 카르복실 말단에 헥사히스티딘으로 태그된 MBP를 NTA-Ni(II) 코팅된 ISFET 표면에 고정화 시킨 다음, 말토오스 결합에 의해 유발되는 구조적 변화를 전하-의존성 축전용량 기반 측정방식으로 모니터링 함.



<그림 4-2> MBP 열린 구조, 닫힌 구조 (A) 및 ISFET 바이오센서 기반 모니터링 시스템 (B)



<그림 4-3> ISFET 기반 MBP 구조변화 측정. AFM 이미지 (A), 말토오스 처리후 드레인 전류변화 (B), 글루코오스 처리후 드레인 전류변화 (C)

<그림 4-3>에서 보는 것처럼, 말토오스에 의한 MBP 구조변화를 이온 감응성 전계 효과 트랜지스터 (IS-FET, ion-sensitive field effect transistor) 소자를 이용하여 분석한 결과, MBP 고정화 이후에 2.617 μA 전류가 감소하였으며, 여기에 말토오스가 처리된 후 전류의 흐름 (drain current)이 1.175 μA 감소하였는데, 이는 MBP 생체분자가 ISFET 표면으로부터 거리가 멀어지게 되고 이에 따라 축전용량 (capacitance)이 감소하게 됨으로써 결국 drain current가 감소하게 되는 이론적 배경으로부터 설명이 가능함.

전하효과 측면에서 보면, MBP는 pI 값이 5.07로서 pH7.4 조건에서는 (-) 전하를 띠게 되는데, 따라서 MBP가 센서 표면에 고정화 되면서 전류가 감소하게 된다는 것이 설명될 수 있음. 하지만 전체적인 MBP 표면전하를 고려하였을 때 말토오스에 의해 (-) 전하의 생체분자가 표면으로부터 멀어지게 됨으로써 드레인 전류가 감소되는 것을 설명할 수가 없는데, 이는 본 실험조건에서 MBP 전체 표면전하 효과는 무시할 정도의 마이너 효과를 보일지도 모른다는 생각을 해 볼 수 있음.

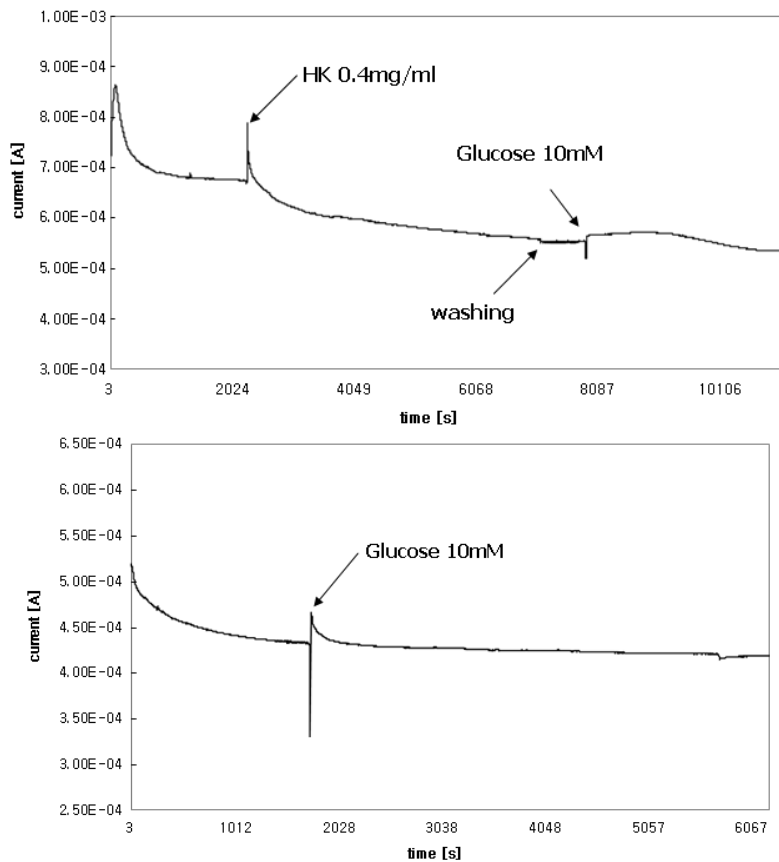
특히, 주목할 부분은 MBP의 아미노산 76-103번 지역이 (+) 전하를 띠고 있는 곳인데, 그 부분이 표면으로부터 멀어질 때 전류의 변화에 가장 크게 영향을 미치는 지역임을 생각해 볼 때, (+) 전하를 나타내는 지역 전하효과가 메이저 효과로 작용한다고 판단됨.

또한, 이러한 전계효과가 기질 특이성에 따른 단백질의 구조변화에 의한 것인지를 확인하기 위해 비특이적 기질로서 글루코오스를 처리하였는데, <그림 4-3 (C)>에서 보는 것처럼 전류 흐름의 변화가 없는 것을 관찰하였고, 이는 기질 특이적 구조변화에 의한 측정 결과라는 것을 입증하는 것임. 따라서, ISFET 바이오센서 연구를 통해 기질특이적인 단백질의 구조변화를 ISFET 바이오센서를 이용하여 모니터링 할 수 있다는 가능성을 제시

해 줌.

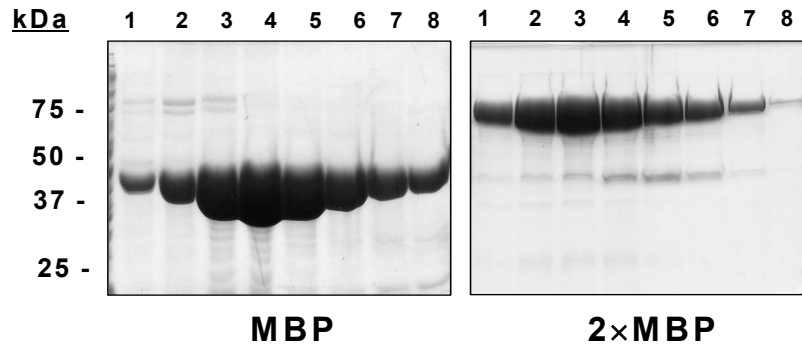
탄소원으로 글루코오스를 사용하여 생체내 화학에너지를 생산하는 글루코오스 대사에서 첫 번째로 반응하는 헥소키나아제는 글루코오스를 인산화 시키는 키나아제로서 글루코오스에 의해 구조적인 변화를 일으키는 특성을 가지고 있으며, 글루코오스에 의해 유발되는 헥소키나아제의 3차원 구조적 변화를 이용하여 새로운 개념의 생물 전자소자용으로의 활용 가능성 있음.

<그림 4-4>에서 보는 것처럼 0.4 mg/ml 농도의 헥소키나아제 단백질을 센서 표면에 고정화시킨 다음 10 mM 글루코오스 처리했을 때, 전기적 변화가 유의한 수준으로 변화하지 않음을 관찰하였으며, 이는 표면 전하효과 및 캐패시턴스 효과 등 복합적인 요인에 의해 전류의 변화가 상쇄되었기 때문이라고 판단됨.



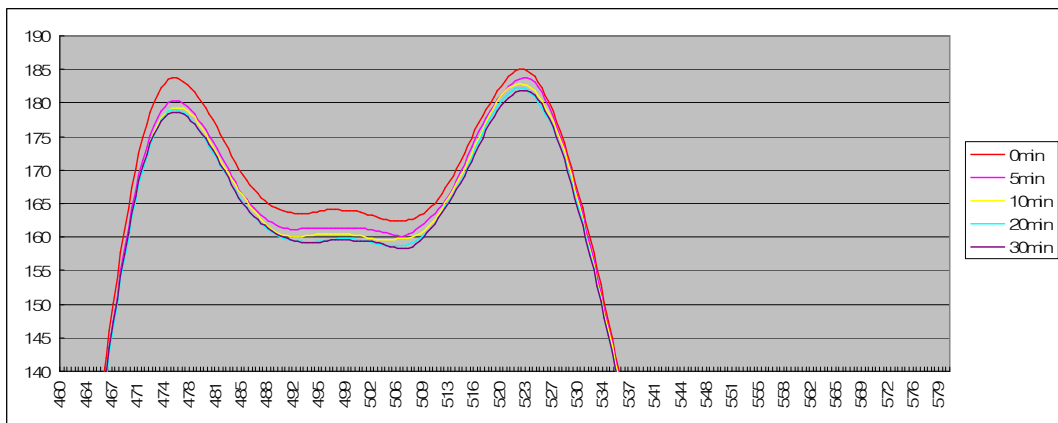
<그림 4-4> 글루코오스에 의한 헥소키나아제의 구조변화 측정 (위), 글루코오스 only (아래)

특정 신호에 의해 구조적 변화를 유발하는 단백질을 FET (Field Effect Transistor) 소자용 바이오 컨텐츠로 이용하기 위해 말토오스에 의해 3차원 구조적 변형을 일으키는 MBP를 선정하였으며, 두 분자의 MBP 구조변화를 검증하기 위해 콘카타머 MBP (2XMBP)를 제작하였음 <그림 4-5>.



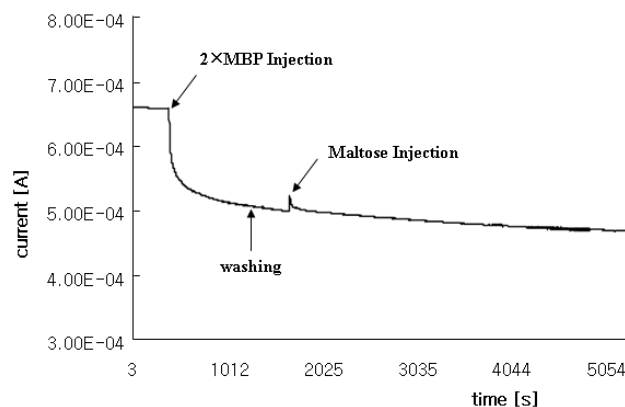
<그림 4-5> 콘카타머 MBP 재조합 단백질 분리

제작된 콘카타머 MBP 양말단에 ECFP 및 EYFP를 유전공학적 방법으로 재설계 하여 ECFP:2XMBP:EYFP 하이브리드 단백질을 발현시켰으며, 말토오스 처리에 의한 FRET 효율의 변화를 관찰함. 콘카타머 MBP를 이용한 FRET 분석결과 donor 및 acceptor 형광 스펙트럼의 변화가 관찰되지 않았으며, 이는 단백질의 구조적인 측면에서 좀 더 세밀하게 분석되어야 할 필요가 있다고 판단됨 <그림 4-6>.



<그림 4-6> 콘카타머 MBP의 FRET 분석

말토오스-유도 콘카타머 MBP (MBP-MBP-His)의 구조변화를 전기적 방식으로 측정하기 위해 ISFET 바이오센서 표면에 MBP 구조변화 분석 실험 조건과 같이 동일하게 측정해 본 결과, 드레인 전류의 변화가 없는 것을 확인하였음 <그림 4-7>.

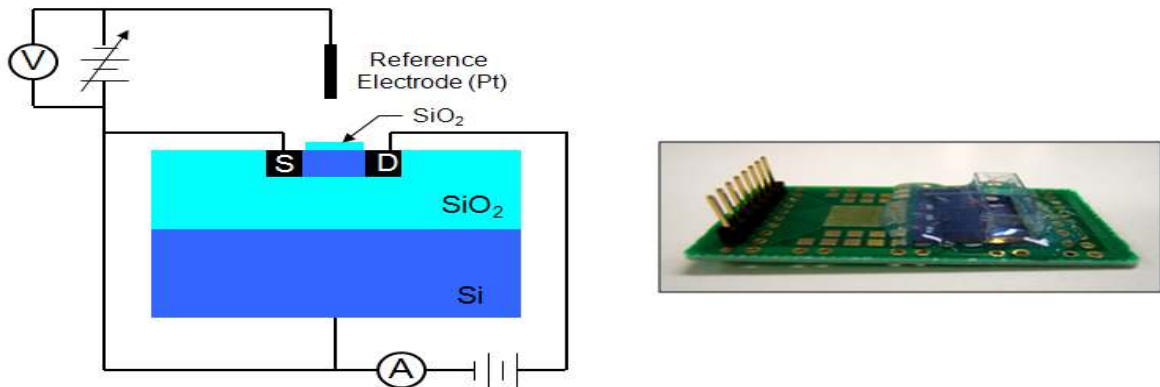


<그림 4-7> ISFET 바이오센서를 이용한 콘카타머 MBP의 구조변화 측정

본 연구를 통해 n-type ISFET 바이오센서를 제작하였으며, 구현된 ISFET 바이오센서 상에서 항체 항원결합 반응을 이용하여 염증 등에 대표적인 마커인 C-reactive protein (CRP)을 검출 분석하였음.

ISFET (ion sensitive field-effect transistor)는 FET 원리를 이용한 FET형 센서 중에서 가장 대표적인 것이며 ISE에 비하여 월등한 장점 (빠른 반응, 초소형 초경량, in-vivo 및 in-situ 측정가능, 단일칩 스마트화 등)을 가지고 있음. 이러한 ISFET 바이오센서는 ISFET과 생체 기능성막을 결합한 소자로서 집적회로 공정기술을 활용하여 제조되므로, 소형화, 규격화 및 양산화가 가능할 뿐만 아니라 신호처리 회로를 함께 집적시킨 스마트센서 제조에 매우 유리함.

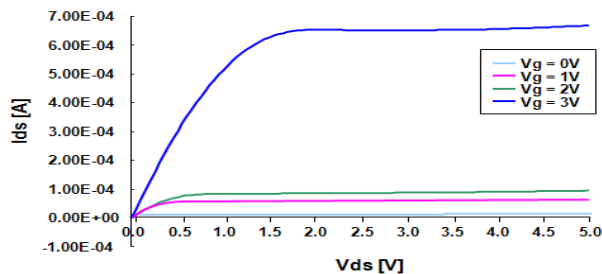
<그림 4-8>는 본 연구에서 제작 사용한 n-type ISFET 바이오센서의 구성 및 실제 센서 사진을 보여줌. 전류-전압 특성이 반도체 표면에 생체분자의 부착에 의하여 표면 전위가 변하는 원리를 이용한 전하-의존성 축전용량 기반 모니터링 시스템 (charge-dependent capacitance measurement system) 임.



<그림 4-8> 본연구에서 사용된 ISFET 바이오센서의 측면도 및 센서 사진

본 연구에서 사용된 ISFET 바이오센서는 표준 CMOS (complementary metal oxide semiconductor) 원리를 이용하였으며 그 제작 과정은 다음과 같음: Starting wafer (5 inch p-type (100) Si wafer, 15 ohm-cm); Photolithography (Active masking, positive PR process); Oxide growth (Wet oxidation, 250 Å (1,100°C, 50 min)); Ion implantation (Phosphorous doping for n⁺S/D); Gate oxide growth (Dry oxidation, 450 Å (950°C, 1 hr)); Photolithography (Gate masking, positive PR process); Photolithography (Contact masking, positive PR process); Metal deposition (Aluminum metallization (100 nm)); Passivation (PECVD deposition (Silicon nitride)).

제작된 ISFET 센서의 표준 Ids-Vds분석 결과 n-type FET 디바이스의 전형적인 linear 그리고 saturated 부분을 보여주었음 <그림 4-9>.

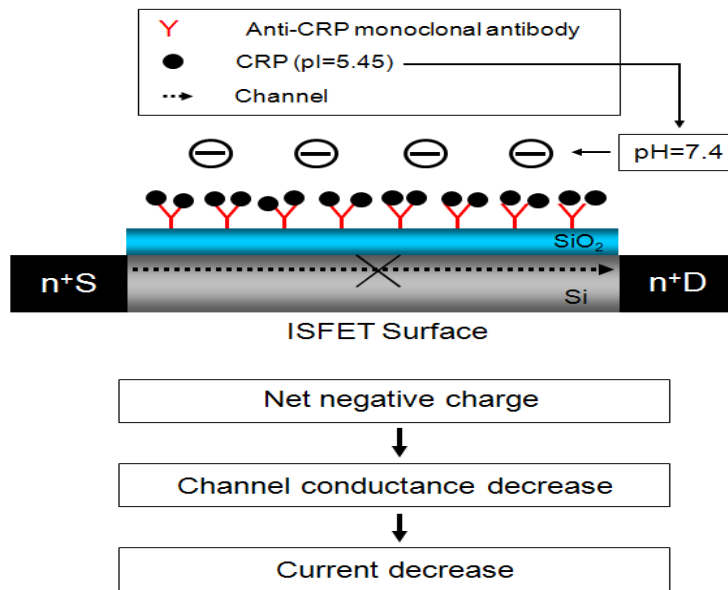


<그림 4-9> 표준 Ids-Vds 분석

이러한 ISFET센서를 이용하여 본 연구에서는 분자진단에서 널리 사용되고 있는 항체 항원결합을 이용한 진단 마커분석을 실시하였음.

CRP 단백질은 대표적인 염증 진단 마커로써 세포의 손상, 감염, 염증 등이 일어났을 때 혈액 내에서 발견되며, 이러한 CRP 단백질량의 상승은 발작 등의 심장관련 질병에 또한 깊은 연관을 보이고 있음. 전하효과 측면에서 보면, CRP 단백질의 pI값은 5.45로서 pH7.4 조건에서는 (-) 전하를 띠게 되는데, 따라서 CRP가 센서 표면에 고정화 되면서 전류의 감소가 예상됨.

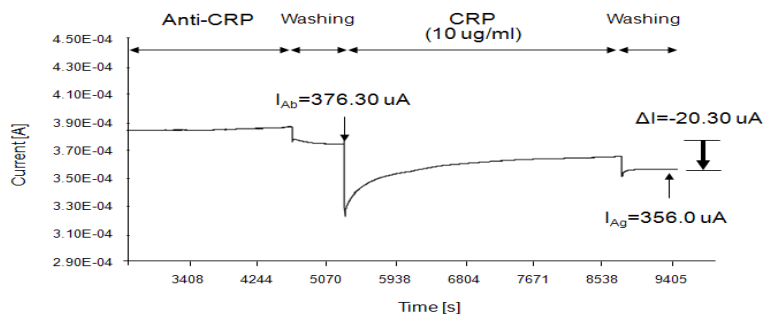
<그림 4-10>는 ISFET 바이오센서를 이용한 CRP 모니터링 모식도를 보여주는 그림이며, gate 의 SiO₂ 표면위에 항체를 고정화하기 위하여 1% 3-aminopropyl-tri-ethoxysilan (APTS)을 이용하여 우선 amine기로 치환하였음. 단백질의 공유결합을 위하여, 만들어진 amine 표면은 다시 poly(ethylene glycol) diglycidyl ether을 10 mM sodium bicarbonate buffer (pH 8.5)에서 한시간동안 반응하여 에폭시로 활성화되었음.



<그림 4-10> 항체 항원 결합을 이용한 ISFET CRP 모니터링 시스템

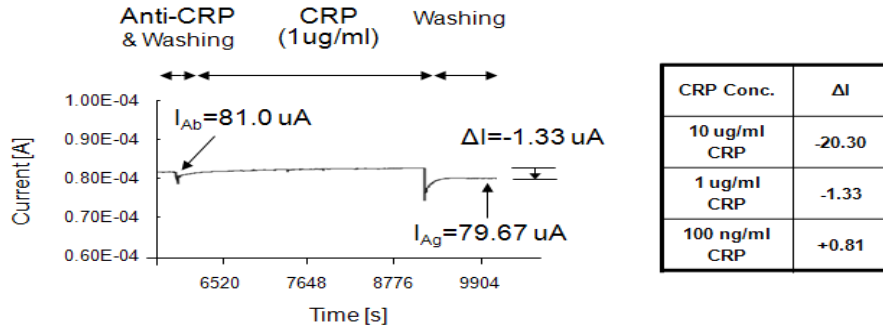
지난해 연구에서도 논의한바와 같이 (-) 전하를 띠고 있는 단백질의 ISFET 표면 고정화는 센서에서의 전류 감소를 보여줌. <그림 4-11>은 CRP 항체와 항원의 순차적 결합에 따른 전류의 흐름 (drain current)변화를 보여주는데 항체의 공유결합 고정화에 의하여 2.0 V에서 고정된 전압상태에서 약 376.3 uA의 전류값을 보여줌.

순차적으로 (10 ug/mL)의 CRP를 항체 표면에 가한 결과 전류값이 356.0 uA로 떨어지는 것을 관찰 하였고, CRP 결합에 의한 전류 감소의 폭은 -20.3 uA을 보여주었음. 이러한 결과는 (-) 전하를 가지고 있는 단백질의 표면 고정화에 따른 ISFET 센서에서의 전류 감소를 다시 한 번 증명하는 결과임.



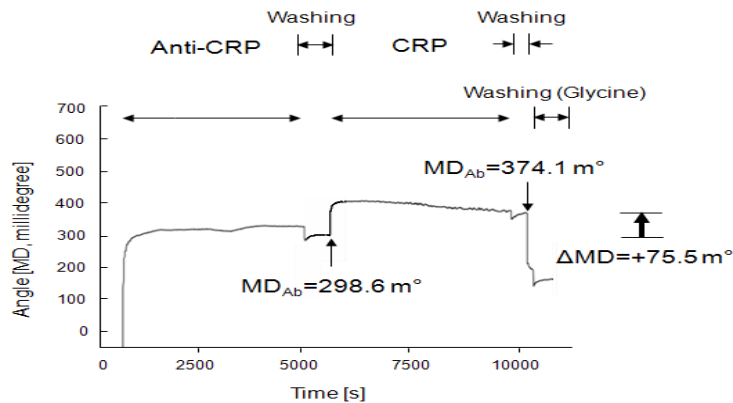
<그림 4-11> CRP 항체 항원 결합에 의한 전류의 흐름 변화

본 연구에서 개발한 ISFET 센서의 CRP 모니터링에 대한 limit of detection (LOD)은 약 1 ug/mL로 (그림 4-12) 아직까지 그 감도는 약한 편이나 심장질환 등의 질병 분석에서의 CRP 혈액 농도가 2-3 ug/mL인점을 감안하여 이러한 진단용으로 사용 할 수 있음을 보여주고 있음.



<그림 4-12> LOD 분석

본 연구에서는 또한 이러한 CRP 항체 항원 반응의 결합을 증명하기 위하여 비슷한 표면과 결합 조건에서의 항체 항원 결합을 표면 플라즈마 공명 (surface plasmon resonance, SPR)을 이용하여 분석하였음.



MD_{Ab} : Angle shift with anti-CRP antibody
 MD_{Ag} : Angle shift with CRP antigen
 $\Delta MD = MD_{Ag} - MD_{Ab}$

<그림 4-13> CRP 항체 항원 결합의 SPR분석

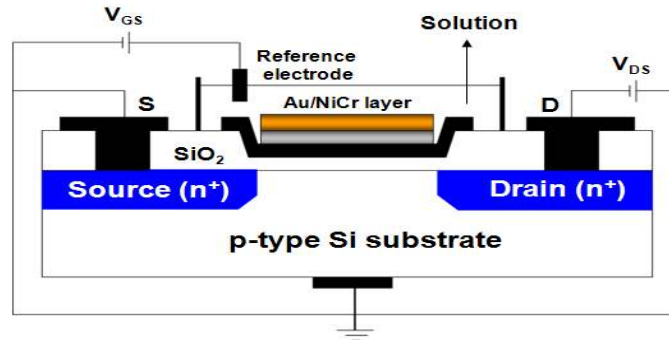
<그림 4-13>에서 볼 수 있듯, 항체의 공유결합후 CRP (10 ug/mL) 항원의 결합에 의하여 75.5 m정도의 angle shift를 보여주고 있으며 이러한 CRP의 결합은 Glycine 버퍼를 가함으로 해서 분리가 되는 것을 관찰 할 수 있었음.

본 연구를 통하여 0.5 um standard CMOS 방법을 통하여 제작된 ISFET 센서 표면위에서 one-step 항체의 고정화를 이루었고 순차적은 항원의 결합을 전류 감소로 확인하였음. 초소형, 경량화가 가능한 FET 센서에서의 항체 항원 결합을 통한 센서 개발은 향후 Portable 센서의 제작에 사용이 기대됨.

본 연구진은 또한 또 다른 FET 기반의 센서인 metal oxide semiconductor field effect transistor (MOSFET)를 제작하여 단백질과 DNA간의 결합을 분석 하고 이를 이용하여 변이 단백질의 모니터링 시스템을 개발하였음.

위의 ISFET (그림 4-8)와 비교하여 MOSFET의 경우 추가적인 gold/nickel 금속 layer가 SiO₂표면위에 형성되어 금속과의 결합을 이용하여 목표하는 바이오인식물질의 고정화가 가능하게 됨. <그림 4-14>은 본 연구에서 제작된 MOSFET센서의 측면도 및 실제 센서

사진을 나타냄.

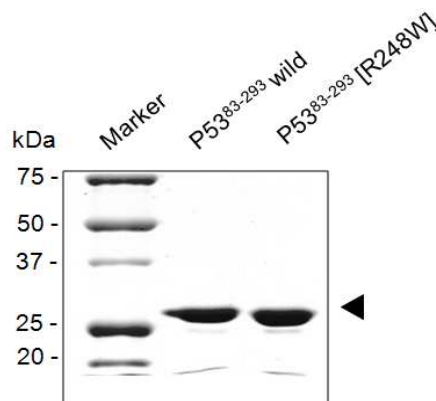


<그림 4-14> MOSFET 센서 모식도 및 사진

MOSFET 디바이스의 경우에도 ISFET의 경우와 동일하게 표준적인 CMOS 방법을 이용하여 제작 되었으며 마지막 단계에서 gold (450 Å) 와 nickel-chromium (50 Å) 합금으로 이루어진 금속 layer가 패터닝 되었음.

p53 단백질은 암 억제 단백질의 하나로 DNA 손상 등이 일어났을 때 활성화 되면 세포내에서의 다양한 유전자 안정성에 중요한 역할을 함. 이러한 p53 단백질의 돌연변이체는 다양한 인체 암에서 가장 빈번하게 나타나며, 특히 돌연변이의 90% 이상이 DNA 결합 도메인에서 발견된다. 이러한 p53 돌연변이체는 표적 유전자의 프로모터 부위에 결합할 수 없게 되어 세포주기 정지, DNA 손상복구, 세포사멸 유도 등 세포반응이 불활성화 됨으로써 결국 세포의 역분화, 즉 암세포가 유도됨.

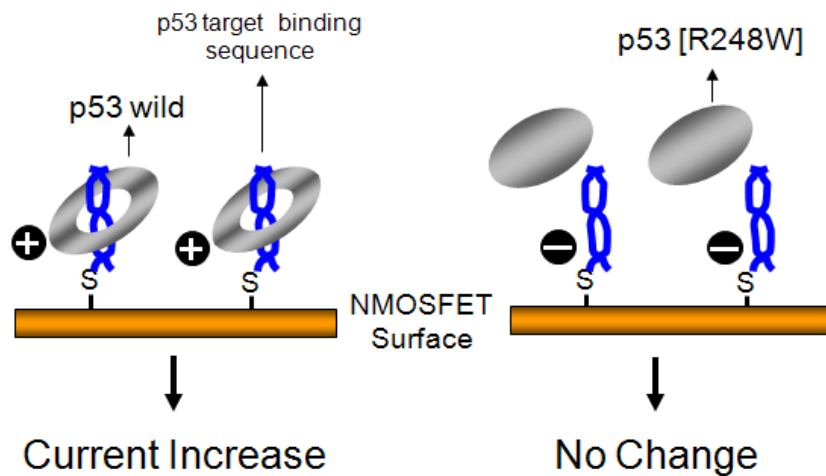
본 과제에서는 이처럼 중앙 생물학 및 세포사멸 연구에서 매우 중요한 역할을 하는 p53 전사인자의 돌연변이를 신속하고 편리하게 검출하기 위한 기술로 전계효과 트랜지스터를 기반으로 한 비표지 전기적 측정 방법을 도입하고자 하며, 이를 위해 wild-type p53 (wt)과 mutant p53 (R248W)의 Core Domain을 분리/정제하였음 <그림 4-15>.



<그림 4-15> wilde type 및 R248W 변이 p53단백질의 발현 정제

p53 (R248W) 단백질의 경우 wt p53단백질이 결합하는 DNA 프로모터 부분에 결합하지 않으며 <그림 4-16>에서 볼 수 있듯이 이러한 성질을 이용하여 MOSFET 금속 표면위에서의 변이 p53 단백질을 모니터링 할 수 있게 됨. 단백질 DNA간의 상호 결합의 분석은 DNA 결합 단백질로서 (+)전하를 가지고 있는 p53 단백질이 표면에 고정화된 타겟 DNA와 결합할 경우 증가하게 되는 전류의 흐름 (drain current)를 MOSFET를 통해 측정하여 이루어지게 되고 변이 단백질의 경우

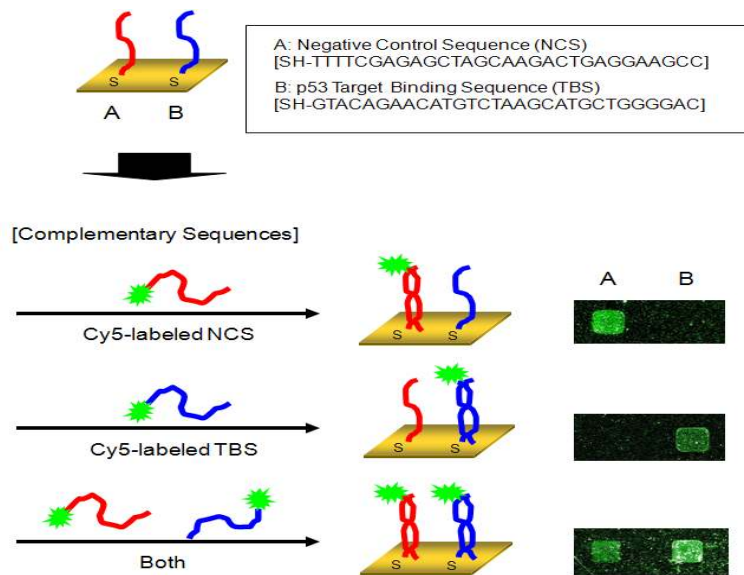
이러한 전류 흐름의 변화가 없을것으로 그 신호를 보내주게 됨.



<그림 4-16> MOSFET를 이용한 변이 p53단백질 분석

본 연구에서는 MOSFET 센서 디바이스에서의 이러한 올리고뉴클레오타이드 고정화를 연구하기 전에 먼저 gold 칩 표면위에 의 single-stranded DNA (ssDNA)의 고정화와 상보적인 ssDNA의 hybridization을 확인하였음.

<그림 4-17>는 본 연구에서 사용되어진 p53 결합 DNA sequence와 이들 ssDNA 의 gold chip에서의 고정화 그리고 상보적인 ssDNA (Cy5 형광 dye포함)의 결합을 형광 스캔 방법을 이용하여 확인한 결과를 보여줌.

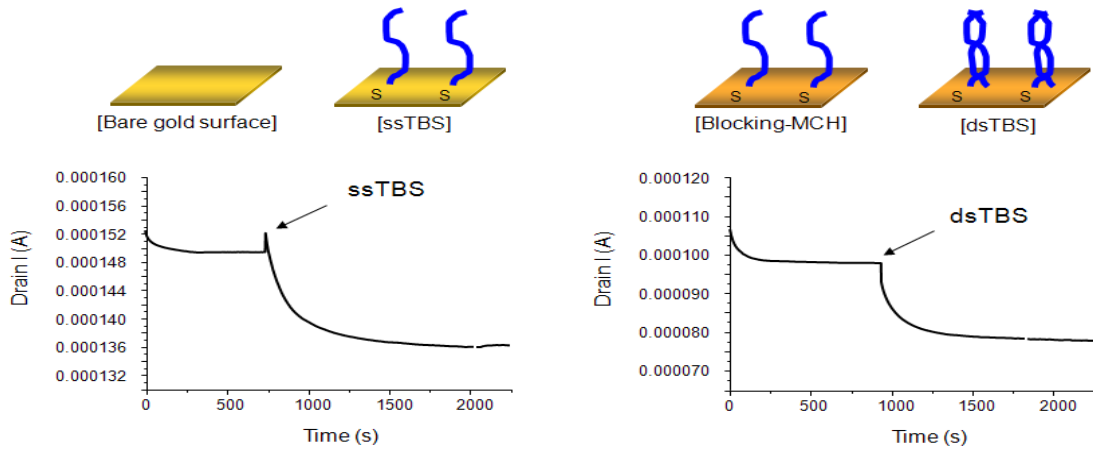


<그림 4-17> gold칩 표면위에서의 p53 결합 DNA의 고정화 test

p53 결합 DNA의 MOSFET 센서 표면 고정화를 위하여 센서 표면은 아세톤, 메탄올, 마지막으로 증류 물로 wash 후 120 W의 Oxygen plasma 처리를 2분 동안 실시함. 본 연구에서 사용된 MOSFET 센서 디바이스의 gate 길이와 폭은 각각 20 um과 600 um이며 50%의 습도를 유지하며 실험을 실시하였음.

먼저 각각의 DNA 고정화 단계를 MOSFET 전류 흐름의 측정을 통해 관찰하였고, <그림 4-18>는 ssDNA (ssTBS; p53 target binding sequence)의 고정화, 표면 passivation, 그리고 상보적인 dsTBS의 고정화에 따른 전류 변화를 보여줌. 2.0 V의 고정된 전압상에서 첫 thiol-modified ssDNA의 결합에 의하여 약 13 uA의 전류가 감소하는 것이 관찰되어지고, 이어지는 상보적 DNA

의 결합에 의하여서도 역시 비슷한 정도의 전류 감소를 관찰 할 수 있었음.



<그림 4-18> DNA 결합에 따른 MOSFET 전류 흐름 변화

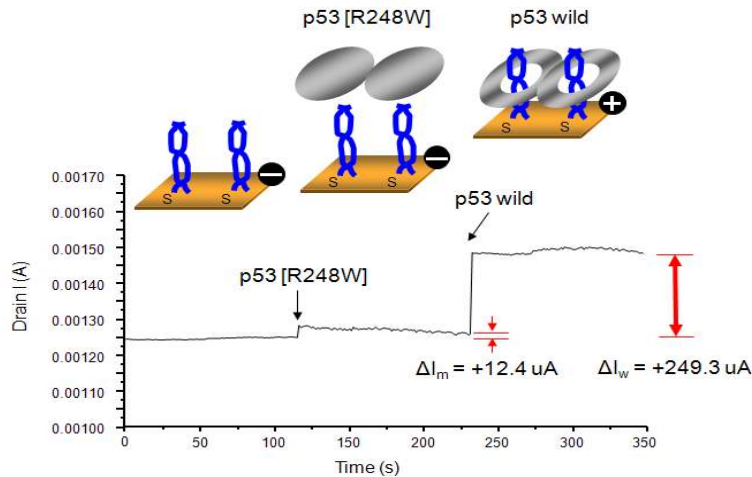
이러한 DNA gate 표면 고정화에 따른 전류의 감소를 이용하여 표면 DNA의 고정화 밀도를 계산 할 수 있으며 위의 실험의 경우 약 3.28×10^{12} (N/m^2)를 보여주고 있음.

본 연구의 MOSFET 바이오센서표면에서의 p53 단백질과 target DNA의 결합을 순차적으로 관찰하였음. 본 연구에서 사용된 p53 단백질 도메인의 경우 약 8.8의 pI값을 보여주어 pH 7.4에서 진행된 본 실험에서 (+)전하를 보여주며 단백질의 표면 고정화에 따라 전류의 증가를 예상 할 수 있음.

<그림 4-19>은 dsTBS 표면위에 변이 p53 (R248W) 단백질과 wt p53 단백질을 순차적으로 가했을 때 관찰되는 MOSFET 센서의 전류 흐름을 보여줌. target DNA와 결합력이 약한 변이 단백질 (100 nM) 을 먼저 가했을때는 매우 약한 전류의 변화만이 관찰 되었으나 (+12.4 uA), 동량의 wt p53를 처리하였을 경우 매우 큰 전류 변화가 관찰됨 (+249.3 uA).

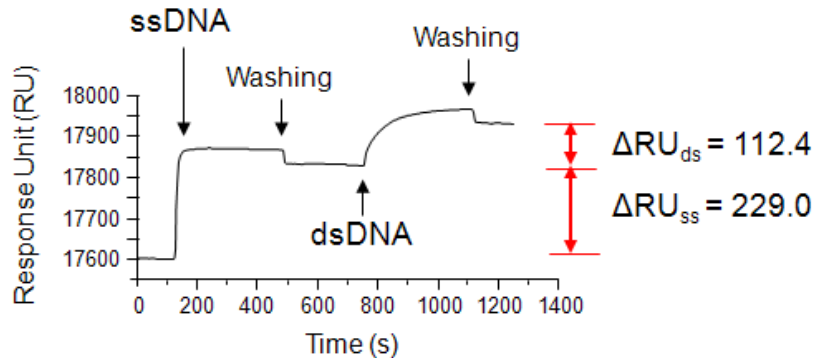
Wt p53 단백질의 표면 결합에 의한 전류 변화값은 상대적으로 높은 (-)전하를 가지고 있는 DNA의 고정화때보다 높은 수치이며 이는 (+) 전하를 가지고 있는 단백질에 의한 전류 상승원리와 (-) 전하를 띄는 DNA 고정화에 의한 전류 감소가 다른 메커니즘을 통해 MOSFET 센서상에서 관찰되어진다고 유추할수 있으며 또한 p53단백질의 결합에 의해서 (+) 전하를 gate 에 증가시킬뿐만 아니라 (-)전하를 가지고 있는 DNA에 shielding까지 관여하고 있다고 생각 할 수 있음.

이러한 시너지 효과를 가지고 있는 p53 단백질 MOSFET 검출 결과는 향후 다양한 바이오 고분자들의 모니터링에 MOSFET 센서 시스템이 효율적으로 사용될수 있음을 보여주고 있음.



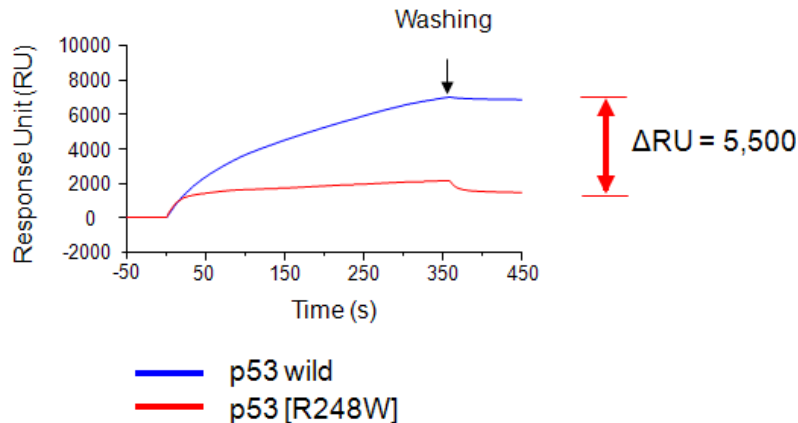
<그림 4-19> MOSFET 센서에 의한 p53 단백질 결합 분석

위의 MOSFET 센서 시스템에 의한 p53 단백질과 target DNA와의 결합은 비슷한 조건의 SPR 센서 시스템으로 또다시 분석하였음. Dextran으로 표면이 passivation되어진 CM5 칩 상에서 streptavidin 표면을 올린후 biotin을 포함하고 있는 ssDNA를 가하였고 Biacore 3000 장비를 사용하여 상보적인 DNA의 결합 그리고 순차적인 p53 단백질들의 결합을 관찰하였음.



<그림 4-20a> DNA 결합 SPR 분석

ssDNA의 결합과 순차적인 상보적 ssDNA의 결합 결과 각각 229.0 그리고 112.4 RU의 SPR signal변화를 보여주었으며, 상보적 DNA의 결합에 의한 상대적으로 낮은 RU 변화는 표면의 steric hindrance에 의한 결합 방해 때문으로 생각됨. <그림 4-20a>



<그림 4-20b> p53 단백질 dsTBS 결합 SPR 분석

<그림 4-20b>는 dsTBS 표면에 p53 wt 그리고 변이 단백질을 가했을때의 SPR signal sensorgram들을 보여주며, 1 uM의 단백질을 표면에 injection하였을 경우 wt p53와 p53(R248W) 변이 단백질의 표면 결합정도의 차이는 5500 RU로 관찰되었음. 상대적으로 많은 차이를 보여주었으나 p53(R248W) 변이 단백질의 경우에도 1500 RU정도의 SPR signal변화를 보여주었음.

MOSFET 센서 시스템의 경우, p53(R248W) 변이 단백질에 의해서 SPR 시스템보다 작은 시그널의 변화를 보여주고 있는데, 각 시스템에서의 표면 성질의 차이와 refractive index의 변화를 측정하는 SPR 시스템과 전하변화를 분석하는 FET 시스템의 차이로 생각 할 수 있으며, 이러한 다양한 분석방법의 제시는 각각의 타겟 바이오 폴리머의 분석에 최적화된 분석 방법의 선택의 중요성을 보여주고 있음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

(1) 연구개발의 최종목표

차세대 정보저장 소자, 바이오킬로 전자칩, Bio-FET 소자 등 나노바이오 전자소자용 생체분자 최적화 기술 및 이를 활용한 유비쿼터스형 바이오 전자소자 기술 개발

(2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	바이오 전자소자용 생체분자의 기능성 부역을 위한 재설계 및 생산기반 구축	<ul style="list-style-type: none"> ● 방향성 분자진화 기반 기능성 단백질 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 돌연변이 유발 세포주를 이용한 MBP의 in vivo 방향성 분자진화 기술 개발 및 라이브러리 구축 ◆ In vitro 방향성 분자진화 기법을 이용한 말토오스 유도 구조변화 기반 기능성 분자 스위치 단백질 개발 ● 신개념 단백질 다중생산 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 카스파제-3 단백질 분해효소 기반 DEVD/IETD 모티프를 이용한 one-step 다중생산 시스템 구현 ◆ One-step 다중생산 시스템 기반 3중 단백질 동시다발적 분리 ● 생체분자 고효율 고정화를 위한 단백질 재설계 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 생체분자 고효율 표면 고정화를 위한 재설계 기술 개발 ◆ 전자소자 표면 밀도개선을 위한 바이오 인터페이스 기술 개발 ● ISFET 바이오센서 기반 생체분석 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> ◆ ISFET 센서를 이용한 콘카타머 MBP의 구조변화 모니터링 ◆ ISFET 소자를 이용한 글루코오스 유도 헥소키나아제 구조변화의 ISFET 측정 ◆ 단백질-단백질, 항체-항원 상호작용에 의해 전류 흐름의 변화를 측정할 수 있으며, 소량, 저농도의 물질까지 검출이 가능한 기능성 PDA 개발
2차년도	바이오 전자소자용 생체분자의 기능성 부역을 위한 재설계 및 생산기반 구축과 생체분자 뱅크	<ul style="list-style-type: none"> ● 바이오전자소자용 기능성 바이오컨텐츠 발굴 및 뱅크 구축 <ul style="list-style-type: none"> ◆ MBP 분자 스위치 단백질 개발 및 단백질 FRET 센서 개발 ◆ RNA구조 특이적 단백질컨텐츠의 확보 및 신규 RNA 결합 단백질 뱅크 구축 ● 생물전자소자용 단백질 고효율 발현 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 대사 조절 대장균의 확보를 통한 단백질 고효율 발현 기술 구현

	<p>구축 및 FET 센서 등의 응용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ One-step biotin label된 단백질의 효율적 생산 시스템 구축 ● ISFET 센서 기반 질병마커 모니터링 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 항체가 고정된 ISFET 바이오센서 개발 ◆ ISFET 바이오센서를 이용한 CRP 모니터링 기술 개발 ● MOSFET 바이오센서 기반 생체분석 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 금속 표면을 포함하는 MOSFET센서 시스템 개발 ◆ DNA 결합을 이용한 p53 단백질 및 변이 단백질의 검출
<p>3차년도</p>	<p>바이오 전자소자용 생체분자 설계 기술 및 이를 활용한 유비쿼터스형 바이오 전자소자 요소 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 바이오전자소자용 바이오컨텐츠뱅크 활성화 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 유비쿼터스 항체 고정화 단백질 확보 ◆ 자기결합 단백질을 이용한 전자소자 바이오컨텐츠 확보 ● 생물전자소자용 인터페이싱 단백질 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 새로운 아비딘 변형체 단백질의 재설계 및 생산 시스템 구축 ◆ Multimeric 형광 단백질 인터페이싱 기술 개발 ● 생물소자를 이용한 생체분석 바이오센서 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ RNA 구조 특이적 바이오전자소자용 생체 프로브 개발 ◆ 구조특이적 RNA 결합 단백질을 이용한 생체분자 분석 시스템 개발 ● 나노바이오소재 이용 생체분자간 전기화학 신호 증폭기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 생체분자의 전기화학적 분석을 위한 프로브 개발 ◆ 생체 프로브를 이용한 전기신호 센서 플랫폼 개발

(3) 계획대비 달성도(선정시 제시된 연구목표)

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	○ 생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계, 생산 및 바이오컨텐츠뱅크 구축	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 돌연변이 유발 세포주를 이용한 MBP의 in vivo 방향성 분자진화 기술 개발 및 라이브러리 구축 ◆ In vitro 방향성 분자진화 기법을 이용한 말토오스 유도 구조변화 기반 기능성 분자 스위치 단백질 개발 ◆ RNA구조 특이적 단백질컨텐츠의 확보 및 신규 RNA 결합 단백질뱅크 구축 ◆ 인터페이싱 링커 단백질컨텐츠 확보 	110
2	○ 생물전자소자용 단백질 고효율 발현 및 생산시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 카스파제-3 단백질 분해효소 기반 DEVD/IETD 모티프를 이용한 one-step 다중생산 시스템 구현 ◆ One-step 다중생산 시스템 기반 3종 단백질 동시 다발적 분리 [MBP, RFP, MBP-RFP] ◆ 대사 조절 대장균의 확보를 통한 단백질 고효율 발현 기술 구현 ◆ One-step biotin label된 단백질의 효율적 생산 시스템 구축 	100
3	○ 생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 생체분자 고효율 표면 고정화를 위한 재설계 기술 개발 [mutimer 페레독신, 형광단백질] ◆ 전자소자 표면 밀도개선을 위한 바이오 인터페이스 기술 개발 [글루코즈옥시다제 변이체-GOD6R] ◆ RNA 결합 프로브를 이용한 인터페이싱 마이크로 RNA 분석 기술 개발 ◆ 생체분자의 전기화학적 분석을 위한 핵산/단백질 생물전자소자 프로브 개발 	100
4	○ FET 센서 기반 생체분석 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ◆ ISFET 센서를 이용한 콘카타머 MBP의 구조변화 모니터링 ◆ ISFET 소자를 이용한 글루코오스 유도 헥소키나아제 구조변화의 ISFET 측정 ◆ 항체가 고정된 ISFET 바이오센서 개발을 통한 CRP 모니터링 기술 개발 ◆ 금속 표면을 포함하는 MOSFET센서 시스템 개발 ◆ DNA 결합을 이용한 p53 단백질 및 변이 단백질의 검출 	110

(4) 위 연구목표(총연구기간)에서 중요도 순으로 4-5개 목표 추출 및 가중치 부여

번호	세부연구목표	가중치
1	생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계, 생산 및 바이오컨텐츠뱅크 구축	30
2	생물전자소자용 단백질 고효율 발현 및 생산시스템 개발	20
3	생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술 개발	20
4	FET 센서 기반 생체분석 시스템 개발	30
계		총 100%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구에서 개발된 생물전자소자용 생체분자 재설계 및 생산 시스템은 메모리용 혹은 진단용 생물전자소자의 최적화에 활용될 것이며 특히 분자진화 기법을 이용한 기능성 단백질의 개발방법은 메모리저장 혹은 전자신호전달 기능을 가지는 생체분자의 제작을 가능하게 할 것임. 더욱이 고효율 발현 생산 시스템의 확립은 상용화 단계에서 유용한 기술이 될 것임. 향후 이러한 바이오컨텐츠 बैं크를 활용한 바이오전자소자 센서 등의 개발을 위하여 센서 디바이스에 따른 혹은 전기신호 전달 방법에 맞춤형 생체분자 최적화 기술이 요구됨
- 알파-아밀레이즈 시그널 서열을 결합시킨 알기닌-글루코즈옥시다제 변이체는 전자소자용 효소의 표면 밀도계선을 가능하게 하여 보다 효율적인 전자신호전달을 보여줄 것이며, 다중 도메인을 가지고 있는 페레독신 혹은 형광단백질을 이용하여 또한 배향성 및 표면 부착능이 향상된 생체분자로서 바이오전자소자로 활용될 것임. 이러한 효소의 직접적 고정화 기능성의 부여뿐 아니라 본 연구에서는 또한 유니버설 링커 역할이 가능한 항체 고정화 단백질, Small 아비딘 링커 등을 개발하여 다양한 타겟 생체분자에 대한 표면 고정화 및 이들을 이용한 전자신호전달 최적화를 링커를 통하여 이룰수 있게 하는 플랫폼을 제시하고 있음. 향후 바이오전자칩 혹은 나노와이어 등의 구조체에 적용하여 보다 다양한 바이오전자소자 분야에 응용이 가능할 것임.
- 또한 본 연구에서 개발된 마이크로 RNA를 결합하는 단백질 혹은 LNA 프로브는 항체 이외에 생체분자를 인식하는 새로운 프로브를 제시하고 있으며 이러한 프로브는 향후 바이오전자센서의 개발에 중요한 역할을 할 것임. 특히 본 연구 3단계 연구에서는 이러한 프로브의 최적화를 통하여 생체분자 인식 시그널을 전자시그널로 전환하는 기술을 최적화하여 바이오전자센서 시스템을 개발 할 것임. 트랜지스터 기반의 FET센서의 개발을 통해 다양한 생체신호 분석기술을 개발하였으며 생체분자 구조변화, 결합변화, DNA/단백질 결합 등의 신호를 트랜지스터상에서 관찰하였음. 이러한 새로운 생체인식 프로브, 인터페이싱 기술, 또한 FET 센서 기술을 융합하여 새로운 바이오전자소자센서의 개발이 가능할 것임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

분자진화기법 혹은 단백질 재설계 기술은 이미 많은 발표되면서 최근에는 이러한 기술들을 이용하여 특이한 기능이 부여된 단백질의 개발에 많은 연구가 이루어지고 있음. 미국과 유럽 선진국을 중심으로 새로운 형광 단백질의 개발, 혹은 신기능 효소개발 등이 중점적으로 이루어지고 있음.

미국 Harvard 대 화학과 David Liu 교수 연구팀은 DNA polymerase 등의 중합 효소를 이용하여 다양한 templated synthesis를 실시하였으며 새로운 반응을 위한 기질 특이성의 변화를 분자진화기법과 화학적 합성방법을 융합하여 이루어 내고 있음.⁷ 이러한 연구들은 생체분자 재설계를 통한 새로운 합성의 가능성을 보여주고 있음.

캐나다 Simon Fraser University에 Hua-Zhong Yu교수 연구팀은 경우 핵산으로 이루어진 압타머에 전기 표지를 중합시키고 이들 압타머와 타겟 생체분자와의 결합에 인한 전기신호변화를 분석하는 바이오전기센서를 제작하였음.⁸ 전극표면에서의 다양한 생체물질의 구조적 변화 등을 전기신호로 변환하는 예를 보여주고 있으나 현재 압타머와 같은 핵산 기반의 인식프로브의 경우 화학적 표지가 용이하여 연구가 이루어지고 있으나 단백질 기반의 경우 전자신호기반 바이오센서 제작에 많은 제한을 받고 있음. 본 연구의 3단계에서는 이러한 바이오전자센서의 개발을 위한 프로브 개발과 인터페이싱 기술 개발을 통해 새로운 바이오전자소자 센서 개발에 관한 연구를 할 것임.

FET 센서와 같은 트랜지스터 기반 바이오센서의 경우는 무표지 관찰이 가능하여 현재에도 많은 연구가 이루어지고 있으며 민감도 및 안정성의 향상을 위하여 연구가 집중적으로 이루어지고 있음. 특히 나노갭센서 혹은 나노포어센서등 나노 구조체를 이용한 트랜지스터 센서의 개발을 통해 민감도 향상 연구가 많이 이루어지고 있음.⁹

제 7 장 참고문헌

1. Ting AY. et al "Redirecting lipoic acid ligase for cell surface protein labeling with small-molecule probes" *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1483-1487.
2. Howarth M. et al "A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability" *Nat. Methods.* 7 (2010) 391-393.
3. Ronkainen NJ. et al "Electrochemical biosensors" *Chemical Society Reviews* 39 (2010) 1747-1763.
4. Yu HZ et al "Design and testing of aptamer-based electrochemical biosensors for proteins and small molecules" *Bioelectrochemistry* 77 (2009) 1-12.
5. Choi YK. "A dielectric-modulated field-effect transistor for biosensing" *Nat. Nanotechnology* 2 (2007) 430-434.
6. Waldo GS. "Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein" *Nat. Biotech.* 23 (2005) 102-107.
7. Liu DR. "Recent progress toward the templated synthesis and directed evolution of sequence-defined synthetic polymers" *Chem. Biol.* 16 (2009) 265-276.
8. Yu HZ. "A robust electronic switch made of immobilized duplex/quadruplex DNA" *Angew Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 9965-9967.
9. Shim JW. "Single molecule sensing by nanopores and nanopore devices." *Analyst* 135 (2010) 441-445.

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 바이오의료기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 바이오의료기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

[첨부1] 연구개발 결과 및 활용계획서

1. 연구개발 결과(연구종료시점까지)

사업명	바이오 전자사업	연구책임자	정용원	주관기관	한국생명공학연구원
과제번호	2005-2001321	과제명	바이오전자소자용 생체분자 생산 및 활용기술 개발		

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)													
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
0	0	12	0	2	6	5	3	1	0	0	1	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)							
학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
0	2	2	0	0	0	1	0

국제협력(단위 :명,건)						
과학자교류		국제협력기반			학술회의개최	
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	국내	국제
0	0	0	0	0	0	1

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)					
기술확산			연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)		
기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료
0	0	0	0	0	0

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지 구분	SCI 여부	IF	국제공동연구 논문여부	기여도
2005-2001321	2008.04	SPR imaging-based monitoring of caspase-3 activation	Park, KyoungsookAhn, JunhyoungYeon, SoKim, MoonilChung, BongHyun	SCI	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	368(3)	국외	SCI등재	02.749(jcr2007)	아니오	30%
2005-2001321	2008.05	Directed immobilization of DNA-binding proteins on a cognate DNA-modified chip surface	Jeong, Eun-JuJeong, YoSeokPark, YoungsookYi, SoYeonAhn, JunhyoungChung, SangJ. Kim, MoonilChung, BongHyun	SCI	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY	135(1)	국외	SCI등재	02.565(jcr2007)	아니오	30%
2005-2001321	2008.10	Blockade of processing/activation of caspase-3 by hypoxia	Han, SangHeeKim, MoonilPark, KyoungsookKim, Tae-HyoungSeol, Dai-Wu	SCI	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	375(4)	국외	SCI등재	02.749(jcr2007)	아니오	50%
2005-2001321	2008.11	Mixed self-assembly of polydiacetylenes for highly specific and sensitive strip biosensors	Park, HyunKyungChung, SangJ. Park, HyunGyuCho, Jae-HyoungKim, MoonilChung, BongHyun	SCI	BIOSENSORS & BIOELECTRONICS	24(3)	국외	SCI등재	05.061(jcr2007)	예	30%
2005-2001321	2008.11	A potent reporter applicable to the monitoring of caspase-3-dependent proteolytic cleavage	Park, KyoungsookKang, Hyo-JinAhn, JunhyoungYi, SoYeonHan, SangHeePark, Hye-JungChung, SangJ. Chung, BongHyunKim, Moonil	SCI	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY	138(39449)	국외	SCI등재	02.565(jcr2007)	아니오	40%

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지 구분	SCI 여부	IF	국제공동연구 논문여부	기여도
2005-2001321	2009.01	An ISFET biosensor for the monitoring of maltose-induced conformational changes in MBP	Park,Hye-JungKim,SangKyuPark,KyoungeosookLy u,Hong-KunLee,Chang-SooChung,SangJ.Yun,WanSooKim,MoonilChun g,BongHyun	직접입력	F E B S LETTERS	583(1)	국외	SCI등재		아니오	50%
2005-2001321	2009.09	Monitoring of Cleavage Preference for Caspase-3 Using Recombinant Protein Substrates	Park,KyoungeosookYi,SoYeonKim,Un-LyoungLee,Chang-SooChung,JinWoongChung,SangJ.Kim,Moonil	SCI	JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	19(9)	국외	SCI등재		아니오	50%
2005-2001321	2009.09	Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing	Lee,Chang-SooKim,SangKyuKim,Moonil	직접입력	SENSORS	9(9)	국외	SCI등재		아니오	50%
2005-2001321	2009.10	Detection of conformationally changed MBP using intramolecular FRET	Park,Kyoungeosook;Lee,LanHee;Shin,Yong-Beom;Yi,SoYeon;Kang,Yong-Won;Sok,Da i-Eun;Chun g,JinWoong;Chung,BongHyun;Kim,Moonil;	직접입력	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	388(3)	국외	SCI등재	02.648(jcr2008)	아니오	40%
2005-2001321	2010.04	Detection of mutant p53 using field-effect transistor biosensor	Han,SangHeeKim,SangKyuPark,KyoungeosookYi,SoYeonPark,Hye-JungLy u,Hong-KunKim,MoonilChun g,BongHyun	SCI	ANALYTICAL CHEMISTRY	665(1)	국외	SCI등재	3.757(jcr2009)	예	40%

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지 구분	SCI 여부	IF	국제공동연구 논문여부	기여도
2005-2001321	2010.09	Poly(arylene ether)s with trifluoromethyl groups via meta-activated nitro displacement reaction	Chung,ImSiKKim,KyounghHoonLee,YoonSubKim,SangYoul	SCI	POLYMER	51(20)	국외	SCI등재	3.573(jcr2009)	아니오	20%
2005-2001321	2010.11	Fabrication of a Structure-Specific RNA Binder for Array Detection of Label-Free MicroRNA	Lee,JeongMinCho,HyunminJung,Yongwon	SCI	ANGEWANDT E CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION	49(46)	국외	SCI등재	11.829(jcr2009)	아니오	60%

지식재산권 성과정보

과제번호	출원등록 연월	재산권 구분	출원등록 구분	발명제목	출원 등록인	출원등록국	발명자명	출원등록번호	활용 형태	기여도
2005-2001321	2008.05.22	특허	출원	동족 DNA로 개질된 기질 표면에 단백질을 고정화 하는 방법		대한민국	정봉현, 김문일, 정은주, 박경숙, 이소연, 안준형	10-2008-0047543		30%
2005-2001321	2008.06.24	특허	출원	대장균 시스템을 이용한 인위적 활성화가 가능한 카스파제 전구체 대량생산 및 활성화 방법			정상전 외	PCT/KR08/003589		10%
2005-2001321	2009.03.05	특허	출원	 전계효과트랜지스터 바이오센서를 이용한 변이 p53 단백질의 검출방법	기관	대한민국	 김문일, 정봉현, 한상희, 박경숙, 이소연, 김상규	10-2009-0018770	미활용	80%
2005-2001321	2010.09.10	특허	출원	신규한 RNA 결합 단백질 및 이를 이용한 무표지 마이크로 RNA 검출 방법	기관	대한민국	정용원, 정봉현, 이정민	10-2010-0089137	기술이전준비중	60%

국제학술대회 초청강연실적 성과정보

과제번호	발표연월	학술대회명	발표자	강연주제	개최국
2005-200132 1	200810	BIOTRONICS 2008 International Conference	Moonil Kim	An ISFET biosensor for the monitoring of maltose-induced conformational changes in MBP	대한민국
2005-200132 1	200906	The 2nd Korea–Russia Joint Symposium in Bioscience and Biotechnology	김문일	Monitoring of maltose-induced conformational change in MBP using FET-type biosensor	러시아

학술대회 논문발표 성과정보

과제번호	발표연월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2005-2001321	200810	Biotronics 2008	Sang Hee Han, Sang Kyu Kim, Moonil Kim	Label-free detection of p53 point mutation using field effect transistor	국제학술대회	대한민국
2005-2001321	200810	Biotronics 2008	Hyun Kyu Park, Sang J. Chung, Hyun Gyu Park, Jae-Hyoung Cho, Moonil Kim, Bong Hyun Chung	Mixed self-assembly of polydiacetylenes for highly specific and sensitive strip biosensors	국제학술대회	대한민국
2005-2001321	200810	Biotronics 2008	Hye-Jung Park, Sang Kyu Kim, Kyoungsook Park, Bong Hyun Chung, Moonil Kim	An ISFET biosensor for the monitoring of maltose-induced conformational changes in MBP	국제학술대회	대한민국
2005-2001321	200905	The 20th International conference on Molecular Electronics and Devices	박혜정	ISFET-based monitoring of C-reactive protein	국제학술대회	대한민국
2005-2001321	201008	nanokorea2010	이정민	Label free array detection of miRNA by structure specific RNA binder	국제학술대회	대한민국
2005-2001321	200804	The 2008 Annual Meeting of the Korean Society for Biotechnology and Bioengineering	Kyoungsook Park, Junhyoung Ahn, So Yeon Yi, Bong Hyun Chung, Moonil Kim	SPR imaging-based monitoring of caspase-3 activation	국내학술대회	대한민국
2005-2001321	200804	The 2008 Annual Meeting of the Korean Society for Biotechnology and Bioengineering	Kyoungsook Park, So Yeon Yi, Moonil Kim	Cleavage preference for caspase-3 between DEVD- and IETD-based substrates	국내학술대회	대한민국
2005-2001321	200904	The 2009 Annual Meeting of the Korean Society for Biotechnology and Bioengineering	박혜정	FET-type biosensor for the monitoring of C-reactive protein	국내학술대회	대한민국
2005-2001321	200910	Biotronics 2009	박경숙	Monitoring of mutant p53	국내학술대회	대한민국

				using MOSFET biosensor		
2005-2001321	200910	Biotronics 2009	한상희	Monitoring of mutant p53 using MOSFET biosensor	국내학술대회	대한민국
2005-2001321	200910	Biotronics 2009	이정민	Label free array detection of miRNA by structure specific RNA binder	국내학술대회	대한민국

수상실적 성과정보

과제번호	수상연월	수상명	수상자		시상기관	시상국가	수상사유
			성명	소속기관			
2005-2001321	200812	마르퀴스 후즈후 세계 인명사전 등재	김문일	한국생명공학연구원	Marquis Who's Who	미국	바이오나노 융합분야 연구에 기여

학위배출인력 성과정보

과제번호	학위취득연월	학위구분	학위취득자				진로
			성명	성별	대학	학과	
2005-2001321	200808	석사	김정원	남	과학기술연합대학원대학	나노바이오공학	취업
2005-2001321	200902	석사	한상희	여	과학기술연합대학원대학교	바이오나노공학	취업(박사후연 구원 포함)

국내외 연수지원 성과정보

과제번호	연수기간	연수명	연수구분	연수자	연수국가	연수기관
2005-2001321	20080401 ~ 20090331	박사후연수	박사후연수	박현규	대한민국	한국생명공학연구원
2005-2001321	20080701 ~ 20081231	박사후연수	박사후연수	최동환	대한민국	한국생명공학연구원

관련강좌 프로그램 개설 성과정보

과제번호	개설기간	프로그램명	프로그램 내용	교육대상	교육시간	인원
2005-2001321	20080808 ~ 20080822	제1회 바이오 기초실험 워크샵	바이오나노 융합연구를 위한 바이오 이론 및 실습 교육	산학연 연구자	36	12

학술회의 개최 성과정보

과제번호	개최기간	학술회의명	규모			발표자		개최장소	지원금액
			참가국	참가인원	학술회의구분	내국인	외국인		
2005-2001321	20081008 ~ 20081008	BIOTronics 2008	6	0	국제학술회의	8	12	제주	3,000,000

2. 연구개발 성과 활용현황 (해당항목에(√)표시)

1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(√)	4.타사업에 활용()
5. 선행 및 기초연구 ()	6. 기타목적활용(교육,연구) ()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

3. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 해당연도 활용계획

본 연구에서 개발된 생물전자소자용 생체분자 재설계 및 생산 시스템은 메모리용 혹은 진단용 생물전자소자의 최적화에 활용될 것이며 특히 분자진화 기법을 이용한 기능성 단백질의 개발방법은 메모리저장 혹은 전자신호전달 기능을 가지는 생체분자의 제작을 가능하게 할 것 임. 특히 당해연도에는 생체분자 재설계 등을 통하여 신기능 생체분자 인식 프로브를 발굴, 최적화 하여 바이오전자소자 센서 개발에 응용하고자함. 또한 본 연구를 통해 개발된 다양한 인터페이싱 기술과 FET센서 기반의 생체신호 분석 연구를 활용하여 유비쿼터스 바이오전자소자 센서 개발에 응용 할 것임.

나. 활용방법

구체적인 활용방법의 예로 본 연구에서 개발된 마이크로 RNA를 결합하는 단백질 혹은 LNA 프로브는 항체 이외에 생체분자를 인식하는 새로운 프로브를 제시하고 있으며 이러한 프로브는 향후 바이오전자센서의 개발에 중요한 역할을 할 것임. 특히 본 연구 차년도 연구에서는 이러한 프로브의 최적화를 통하여 생체분자 인식 시그널을 전자시그널로 전환하는 기술을 최적화하여 바이오전자센서 시스템을 개발 할 것임. 트랜지스터 기반의 FET센서의 개발을 통해 다양한 생체신호 분석기술을 개발하였으며 생체분자 구조변화, 결합변화, DNA/단백질 결합 등의 신호를 트랜지스터상에서 관찰하였음. 이러한 새로운 생체인식 프로브, 인터페이싱 기술, 또한 FET 센서 기술을 융합하여 새로운 바이오전자소자센서의 개발이 가능할 것임.

다. 차년도이후 활용계획(6차 원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 연구 이후 3단계 연구에서는 바이오전자소자기반 센서 개발을 위한 생체분자 분석 프로브 개발 및 인터페이싱 기술 개발 그리고 이를 활용한 바이오전자센서 시스템 확립하는 것을 목표로 본 연구과제의 1단계 및 2단계 과정에서 개발한 바이오컨텐츠 발굴, 재설계, 생산 기술 및 트랜지스터 바이오센서 기술 등의 핵심기술을 이용하여 전자소자 생체분자인식 프로브를 개발하고 이들의 응용 인터페이싱 기술을 확립하여 유니버설 바이오전자센서를 개발하고자 함. 또한 향후에 이들 바

이오전자센서의 최적화와 IT, NT 분야와의 융합 연구를 통해 유비쿼터스 진단 시스템의 개발에 활용 할 것임.

4. 기대효과

- 전기신호 기반 바이오센서 분야의 발전은 특이적 바이오컨텐츠의 한정된 Pool 에 많은 제한을 받고 있으며 이러한 제한은 본 연구에서 제시하는 새로운 전기신호 전달 생체물질 인식 프로브의 활용을 기반으로 많은 개선이 예상된다. 구체적으로는 현재 비약적인 발전을 이루고 있는 BT, IT, NT 융합기술의 대표적 기술로 실질적 예시를 보여주는 기술로 성장 할 것이며 이러한 기술의 비약은 각각의 기술들의 발전에 또한 긍정적인 영향을 줄 것이며 특히 NT기반의 새로운 센서 디바이스의 개발과 BT기반의 새로운 프로브를 이용한 원천 센서 기술을 개발하고 IT기술을 이용한 유비쿼터스 센서 시스템의 개발에 큰 영향을 줄 것임.
- 원천성을 가지는 새로운 바이오진단 분야를 위하여 최근 생체적용을 위한 바이오나노 융합기술에 관한 연구가 많이 진행되고 있으나, 아직 상용화에는 기술수준이 낮으므로 고감도 바이오 분석 및 진단기술 개발을 통하여 우수한 특성을 지닌 소재 및 소자기술을 최적화하여 체외 생체진단기술을 개발하는 것은 상용화가 가능한 산업원천기술로의 충분한 가치가 있음. 본 연구와 같이 원천적인 생체분자 프로브를 기반으로 하여 나노, 전자 기술의 융합을 통한 POT 진단 기술의 개발은 저부가가치의 소형 진단 킷에 제한되어 있는 국내 바이오진단 시장에 새로운 성장동력으로 개대됨.

5. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

해당사항 없음

[별지 제7호서식]

자체평가의견서

1. 과제현황

				과제코드	2005-01321
부처사업명(대)	바이오 의료기술개발사업				
사업명(중)	첨단의료기반기술개발사업				
세부사업명(소)	바이오 인터페이스 기술 개발사업				
부처 기술분류 ^{주1)}	(대)	(중)	(소)	국가기술지도 (NTRM)	B020218
국가과학기술 표준분류체계	E1002	E0702	E0601		
총괄과제	생물분자로 구성된 바이오전자소자 기술 개발			총괄책임자(기관)	최정우 (서강대학교)
과제명	바이오전자소자용 단백질 설계 및 생산기술 개발			연구단계	2 단계
연구기관	한국생명공학연구원			연구책임자	정용원
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2008.04-2009.03	250,000		250,000
	2차연도	2009.04-2010.03	225,000		225,000
	3차연도	2010.04-2011.03	214,000		214,000
	4차연도				
	5차연도				
계			689,000		689,000
참여기업	해당사항 없음				
상대국	해당사항 없음	상대국 연구기관		해당사항 없음	

주1) 부처 기술분류코드 기재 불필요.

2. 평가일 : 2011년 2월 20일

3. 평가자

소속	직위	성명	서명
한국생명공학연구원	선임연구원	정용원	

4. 평가자 확인

본인은 평가대상 과제의 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 이 자료가 전문가 및 전문기관 평가시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다

확약	정용원 (인)
----	---------

(붙임)

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성 및 창의성

단백질 분자진화기법 및 재설계를 통하여 단백질 구조변화 모니터링 변이체, 생체 인식 단백질, 인터페이싱 단백질 등을 발굴, 생산 하였으며 또한 이들의 효율적인 생산을 위하여 고효율 단백질 발현 생산 시스템을 개발하였음. 또한 이들 단백질의 전자소자-디바이스 표면에서의 인터페이싱 기술 개발과 FET 센서 기반의 생체신호 모니터링 기술을 개발 함으로써 생물분자 기반의 바이오전자소자 기술을 개발하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

현재 비약적인 발전을 이루고 있는 BT, IT, NT 융합기술의 대표적 기술로 실질적 예시를 보여주는 기술로 성장 할 것이며 이러한 기술의 비약은 각각의 기술들의 발전에 또한 긍정적인 영향을 줄 것이고 특히 NT기반의 새로운 센서 디바이스의 개발과 BT기반의 새로운 프로브를 이용한 원천 센서 기술을 개발하고 IT기술을 이용한 유비쿼터스 센서 시스템의 개발에 큰 영향을 줄 것임.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

본 연구에서 개발한 바이오컨텐츠 발굴, 재설계, 생산 기술 및 트랜지스터 바이오센서 기술 등의 핵심기술을 이용하여 전자소자 생체분자인식 프로브를 개발하고 이들의 응용 인터페이싱 기술을 확립하여 유니버설 바이오전자센서를 개발하고자 함. 또한 향후에 이들 바이오전자센서의 최적화와 IT, NT 분야와의 융합 연구를 통해 유비쿼터스 진단 시스템의 개발에 활용 할 것임.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

바이오전자소자 분야에 필요한 바이오컨텐츠의 제작을 위하여 다양한 단백질과 이들의 변이체를 확보하였으며 또한 이들의 활용을 위하여 각종 디바이스 표면에서의 특성을 파악하였고 또한 FET센서 등에 활용을 통하여 그 가능성을 입증, 이를 바탕으로 한 논문 게재, 특허 출원 및 학술대회 발표를 수행하여 당해단계의 연구 목표를 성실히 달성 함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문·지적재산권·발표회 개최 등)

제조합 단백질 생산시스템, 칩기반 단백질 상호작용 분석, 단백질 구조변화 모니터링, 구조변화 단백질 기능규명, 단백질 수용화 효율 향상기술, 단백질 상호작용 검출 방법 등 12편의 SCI 논문을 게재하였음.

- 특허출원 및 등록 (총 4건) - 출원 3건, 등록 1건
- 논문 (총 12편) - SCI 12편 (IF 10 이상 - 1편)
- 학술회의 발표 (총 11회) - 국외학회 5회 / 국내학회 6회

II. 연구목표 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	○ 생물전자소자용 생체분자 발굴, 재설계, 생산 및 바이오컨텐츠뱅크 구축	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 돌연변이 유발 세포주를 이용한 MBP의 in vivo 방향성 분자진화 기술 개발 및 라이브러리 구축 ◆ In vitro 방향성 분자진화 기법을 이용한 말토오스 유도 구조변화 기반 기능성 분자 스위치 단백질 개발 ◆ RNA구조 특이적 단백질컨텐츠의 확보 및 신규 RNA 결합 단백질뱅크 구축 ◆ 인터페이싱 링커 단백질컨텐츠 확보 	110
2	○ 생물전자소자용 단백질 고효율 발현 및 생산시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 카스파제-3 단백질 분해효소 기반 DEVD/IETD 모티프를 이용한 one-step 다중생산 시스템 구현 ◆ One-step 다중생산 시스템 기반 3종 단백질 동시다발적 분리 [MBP, RFP, MBP-RFP] ◆ 대사 조절 대장균의 확보를 통한 단백질 고효율 발현 기술 구현 ◆ One-step biotin label된 단백질의 효율적 생산 시스템 구축 	100
3	○ 생물전자소자-디바이스 유비쿼터스 인터페이싱 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 생체분자 고효율 표면 고정화를 위한 재설계 기술 개발 [mutimer 페레독신, 형광단백질] ◆ 전자소자 표면 밀도개선을 위한 바이오 인터페이스 기술 개발 [글루코즈옥시다제 변이체-GOD6R] ◆ RNA 결합 프로브를 이용한 인터페이싱 마이크로 RNA 분석 기술 개발 ◆ 생체분자의 전기화학적 분석을 위한 핵산/단백질 생물전자소자 프로브 개발 	100
4	○ FET 센서 기반 생체분석 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ◆ ISFET 센서를 이용한 콘카타머 MBP의 구조변화 모니터링 ◆ ISFET 소자를 이용한 글루코오스 유도 핵소키나아제 구조변화의 ISFET 측정 ◆ 항체가 고정된 ISFET 바이오센서 개발을 통한 CRP 모니터링 기술 개발 ◆ 금속 표면을 포함하는 MOSFET센서 시스템 개발 ◆ DNA 결합을 이용한 p53 단백질 및 변이 단백질의 검출 	110

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

표면 고정화와 같은 디바이스-인터페이싱, 구조변화 모니터링을 가능하게 하는 단백질 변이체, 생체분자를 인식하는 단백질 프로브 등의 개발을 통해 단백질의 기능성 부여 기술을 개발 하였으며 이러한 신기능 단백질 들은 생물 정보저장용 전자소자, 광수용소자, 나노바이오센서 등 바이오전자소자 기술에 필수 요소 중에 하나가 될 것임. 또한 이들 단백질을 이용한 FET 센서 등의 디바이스 활용 기술은 융합 연구의 좋은 예시가 되며 향후 나노바이오 전자소자 분야의 발전에 크게 기여할 수 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

바이오전자소자 기술의 효과적인 융합연구를 위하여 바이오컨텐츠의 발굴, 디바이스 최적화, 인터페이싱 기술 개발, 활용기술 개발 등 다양한 분야의 연구개발이 필요하며 이들의 유기적인 연구 또한 중요함. 이에 본 연구과제에서는 바이오컨텐츠의 발굴 및 재설계를 중심으로 하여 진단용 혹은 정보저장용 등 각각의 기능성에 최적화된 기능성 단백질의 발굴을 위하여 분자진단, 재설계 방법을 개발하였으며 이들 단백질의 최적화된 생산 시스템을 확립하였고 다양한 FET센서 플랫폼에서의 활용 예시를 제시하였음.

3. 연구개발결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구결과를 바탕으로 하여 다음 단계 연구에서는 구체적인 바이오전자소자 센서 시스템의 개발에 중점을 둘 것이며 이를 위하여 개발된 생체인식 단백질 등의 전기신호전달 최적화와, 인터페이싱 기술을 이용한 센서 디바이스 표면 최적화 연구를 실시 할 것이며 각 세부과제와의 긴밀한 협력연구를 통하여 단백질의 최적화를 통한 바이오전자칩 및 바이오나노 구조체 에서의 효율적인 바이오전자 센서를 개발하고자 함.

Ⅳ. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당사항 없음