



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년06월08일  
 (11) 등록번호 10-1627832  
 (24) 등록일자 2016년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G11C 11/54 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0049260

(22) 출원일자 2014년04월24일

심사청구일자 2014년04월24일

(65) 공개번호 10-2015-0123373

(43) 공개일자 2015년11월04일

(56) 선행기술조사문헌

Yong-Ho Chung et al., 'Multilevel electrochemical signal detections of metalloprotein heterolayers for bioelectronic device', Thin Solid Films, Vol. 551, 174-180, Jan. 2014.\*

Taek Lee et al., 'Multilevel Biomemory Device Consisting of Recombinant Azurin/Cytochrome c', Advanced Materials, Vol. 22, Issue 4, pages 510-514, Jan. 2010.\*

Taek Lee et al., 'Bioprocessing Device Composed of Protein/DNA/Inorganic Material Hybrid', Advanced Functional Materials, Vol. 24, Issue 12, pages 1781-1789, March 26, 2014.\*

KR100928561 B1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

최정우

서울특별시 용산구 서빙고로 35, 103-603 (한강로3가, 용산시티파크1단지)

이택

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

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 10 항

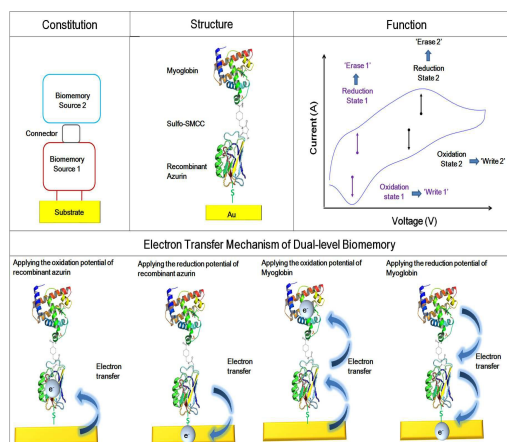
심사관 : 손윤식

(54) 발명의 명칭 **융합 단백질-기반 이중상 바이오메모리 장치**

**(57) 요약**

본 발명은 산화환원능(redox potential)을 갖는 융합 단백질(fusion protein)이 직접 기판에 고정화되어 있는 이중상(dual-level) 바이오메모리 장치에 관한 것으로, 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치는 단일 장치 내 다양한 정보를 저장할 수 있으며, 앞으로의 단일 분자-기반 이중상 정보 저장 시스템을 개발하기 위한 강력한 대안이 될 것이다.

**대표도 - 도3**



(72) 발명자

**윤진호**

서울 서초구 서운로 221, 102동 2105호 (서초동,  
래미안서초스위트)

**민준홍**

서울 동작구 흑석로 84

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201333030

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외 우수연구기관 유치사업

연구과제명 서강-하버드 질병 바이옴리 연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

천연 화학적 라이게이션(Native Chemical Ligation)을 통해 결합된 아주린 및 미오글로빈을 포함하는 융합 단백질(fusion protein)이 상기 아주린에 도입된 시스테인 잔기에 의해 직접 기관에 고정화되어 있는 이중상(dual-level) 바이오메모리 장치.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 기관은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO<sub>2</sub> 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스인 것을 특징으로 하는 이중상 바이오메모리 장치.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 기관은 금(Au) 기관인 것을 특징으로 하는 이중상 바이오메모리 장치.

#### 청구항 9

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

#### 청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 이중상 바이오메모리 장치는 9 가지 경우의 정보를 저장할 수 있는 것을 특징으로 하는 이중상 바이오메모리 장치.

#### 청구항 11

다음 단계를 포함하는 이중상(dual-level) 바이오메모리 장치의 제조방법:

- (a) 천연 화학적 라이게이션(Native Chemical Ligation)을 통해 아주린 및 미오글로빈을 결합시켜 융합 단백질을 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 융합 단백질의 아주린에 도입된 시스테인 잔기에 의해 직접 기판에 고정시키는 단계.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

제 11 항에 있어서, 상기 기판은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO<sub>2</sub> 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제 17 항에 있어서, 상기 기판은 금(Au) 기판인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제 11 항에 있어서, 상기 이중상 바이오메모리 장치는 환원 전위 및 산화 전위의 인가에 의해 작동되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제 11 항에 있어서, 상기 이중상 바이오메모리 장치는 9 가지 경우의 정보를 저장할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 융합 단백질-기반 이중상 바이오메모리 장치에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

- [0002] 생물 내 전자전달 반응을 통해 에너지를 전달하는 몇몇 금속 단백질 및 효소는 정상적인 생물 세포에서 중요한 역할을 한다(Bartlett, 2008; Messerschmidt et al., 2001). 일반적으로, 생물학적 세포는 서로 이온을 교환하는 다양한 금속 단백질 및 효소를 포함한다(Bertini et al., 2001). 이러한 금속 단백질은 세포 내에 광합성 또는 대사 과정과 같은 다양한 필수 기능을 수행하기 위한 전자 전달이 가능한 금속 이온을 포함하고 있다. 금속 단백질은 내부 금속 이온의 산화 및 환원에 의한 산화-환원 반응의 특성을 갖는다(Kennedy et al., 2001). 기존의 금속 단백질에 대한 연구는 전자 전달의 전기화학적 특성, 구조 및 기작에 중점을 두었다(Holm et al., 1996).
- [0003] 한편, 나노기술의 발전은 바이오센서, 바이오칩 및 바이오전자 장치의 센싱 요소 또는 활성 재료로써 생체분자의 적용을 이끌었다(Petty, 2006; Noy, 2011). 특히, 지난 10년 동안, 생체 전자공학은 빠르게 성장하였고, 특이적 특징을 갖는 검출 튜, 논리 게이트, 컴퓨팅 장치 및 기억 장치 등의 몇몇 형태의 장치를 고안하였다(Katz et al., 2010).
- [0004] 생체 전자공학 장치의 요소로써, 생체 전자공학 장치에 적용된 항체, 효소와 같은 생체분자는 항체-항원 결합, 효소-기질 결합과 관련된 본래의 특성을 모사하였다(Niemeyer et al, 2004). 또한, Wilner 연구진은 효소 및 금속 단백질로 구성된 논리 게이트, 트랜지스터와 같은 다양한 형태의 생체 전자공학 장치를 제안하였다(Willner et al., 2005 Alessandrini et al., 2005).
- [0005] 2000년 이후에, 최 교수 연구진은 정류전류가 GFP/비올로젠(viologen)으로 구성된 생체분자-기반 광 다이오드(Choi et al., 2001), 박테리오토돕신(bacteriorhodopsin)으로 구성된 단순 비주얼 정보 프로세서(Min et al., 2001), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)의 검출을 위한 SPC-기반 바이오센서(Oh et al., 2004)와 같은 다양한 생체 전자공학 장치를 개발하였다. 연구진은 또한 금속 이온의 산화-환원 특성에 의한 금속 단백질-기반 바이오메모리 장치의 기본 개념을 제안하였다(Choi et al., 2007). 이전에, 단백질 이중층 내 다중 비트를 저장할 수 있는 아주린/시토크롬 c 이중층으로 구성된 이중상 바이오메모리 장치를 제시하였다(Lee et al., 2010). 또한, 다양한 기억 기능을 나타내는 바이오메모리 장치를 개발하였다(Lee et al., 2011).
- [0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 본 발명자들은 종래의 실리콘-기반 메모리 장치의 전류 한계를 극복하고, 단일 장치 내 다양한 정보를 저장할 수 있는 메모리 장치를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 금속 단백질을 결합시킨 융합 단백질(fusion protein)을 직접 기판에 고정화하여 다양한 정보를 저장할 수 있는 이중상(dual-level) 바이오메모리 장치를 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 이중상 바이오메모리 장치를 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 이중상 바이오메모리 장치의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 산화환원능(redox potential)을 갖는 융합 단백질(fusion protein)이 직접 기판에 고정화되어 있는 이중상(dual-level) 바이오메모리 장치를 제공한다.

- [0012] 본 발명자들은 종래의 실리콘-기반 메모리 장치의 전류 한계를 극복하고, 단일 장치 내 다양한 정보를 저장할 수 있는 메모리 장치를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 금속 단백질을 결합시킨 융합 단백질(fusion protein)을 직접 기판에 고정화하여 다양한 정보를 저장할 수 있는 이중상(dual-level) 바이오메모리 장치를 개발하였다.
- [0013] 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치를 구성하는 주요한 요소는 산화환원능을 갖는 융합 단백질이다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 융합 금속 이온을 포함하는 둘 이상의 금속 단백질(metalloprotein)이 결합된 융합 단백질이다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 융합 단백질은 아주린, 미오글로빈, 헤모글로빈, 헤메리트린, 혈색소, 시토크롬, 철-황 단백질, 루브레독신, 플라스토시아닌, 페리틴, 셀룰로프라스민, 탄산 탈수 효소, 비타민 B12-종속 효소, 니트로게나아제, 슈퍼옥사이드 디스무타제, 엽록소-포함 단백질, 칼모둘린, 글루코스-6-포스파타제, 헥소키나아제, DNA 폴리머라아제, 바나빈, 아르기나아제, 카탈라아제, 수소화 효소, 철반응요소결합단백질, 아코니타제, 우레아제, 시토크롬 산화 효소, 라케이스, 알코올 탈수소 효소, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제,  $\beta$ -아밀로이드단백질, 질산 환원 효소, 글루타티온과산화효소, 메탈로티오네인 및 포스파타아제로 구성된 군으로부터 선택되는 둘 이상의 금속 단백질이 결합된 융합 단백질이다.
- [0016] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 융합 단백질은 아주린 및 미오글로빈이 결합된 융합 단백질이다.
- [0017] 본 발명의 융합 단백질을 구성하는 아주린은 N-말단 또는 C-말단에 시스테인 잔기를 도입시켜 기판 상에서 안정된 자가-조립(self-assembly) 되도록 한다. 도입된 시스테인 잔기는 티올기를 통하여, 기판 상에 우수한 배향성(orientation)으로 안정된 층을 형성하도록 한다.
- [0018] 상기 아주린에 도입된 시스테인 잔기의 수는 2-10개이다. 만일, 도입된 시스테인 잔기의 수가 2개 미만, 즉 1개인 경우에는 앵커링(anchoring) 부위로서의 시스테인 잔기의 기능의 크게 감소한다. 만일, 시스테인 잔기의 수가 10개를 초과하는 경우에는 도입된 시스테인 사이에 다이설파이드 결합을 형성하여 재조합 단백질을 정제하기 어려울 뿐만 아니라, 앵커링(anchoring) 부위로서의 시스테인 잔기의 기능의 크게 감소한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아주린은 시스테인 잔기가 도입되어 기판에 직접 고정화 된다.
- [0020] 도입된 시스테인의 티올기를 통한 단백질의 고정화는 본 명세서에서 직접 고정화(direct immobilization)로 표현되어 있다. 용어 “직접 고정화”는 다른 링커의 도움 없이 단백질 내에 있는 분자를 통하여 단백질이 직접 기판에 고정화되는 것을 의미한다. 이러한 직접 고정화를 통하여, 전자 전달 과정의 불필요한 저항층을 줄일 수 있다는 이점이 있으며 고정화능 또한 주어진 조건에서 최대화할 수 있는 장점이 있다. 단백질을 기판에 고정화 하는 기술로서, 현재 가장 많이 이용되는 것은 링커를 이용하는 것이다. 그러나, 이 방법은 (i) 지나치게 많은 공정을 필요로 하고, (ii) 낮은 고정화율을 나타내며, (iii) 링커층의 차단효과(insulating effect)를 초래한다는 단점이 있다.
- [0021] 본 발명의 직접 고정화를 이용하는 경우에는 이러한 종래기술의 문제점을 해결할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치를 구성하는 융합 단백질 중 하나인 미오글로빈은 아주린과 링커를 통해 결합되어 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미오글로빈은 천연 화학적 라이게이션(native chemical ligation)을 통해 상기 아주린과 결합된다.
- [0024] 본 명세서에서, 용어 “천연 화학적 라이게이션(Native Chemical Ligation; NCL)”은 20°C 이상 37°C 이하의 온도 및 pH 7.0의 pH를 갖는 수성 완충액에서 제1비보호 단백질(또는 펩타이드)의 N-말단의 시스테인 잔기의 티올레이트기가 제2비보호 단백질(또는 펩타이드)의 C-말단의 티오에스테르와 반응하여 상기 제1비보호 단백질 및 제2비보호 단백질이 결합되게 된다. 이러한 가역적(reversible)인 트랜스티오에스테르화(transesterification) 단계는 화학선택적(chemoselective) 및 위치선택적(regioselective)이며, 티오에스테르 중간체가 형성되게 된다. 이러한 중간체는 분자 내의 S,N-아실 이동에 의해, 재배열되어 라이게이션 부위에 천연 아마이드 결합을 형성시킨다(도 1). NCL 반응은 티올 첨가물에 의한 인 시츄 트랜스티오에스테르화에 의해 촉매된다. 가장 대표적인 티올 촉매물은 티오펜일(thiophenyl), 4-머캅토펜일아세트산(4-mercaptophenylacetic acid; MPAA) 또는 2-머캅토테탄설포산염(2-mercaptoethanesulfonate; MESNa)이다. NCL

의 주요 특징은 티올(염)-티오에스테르[thiol(ate)-thioester] 교환 반응인 첫번째 단계의 가역성이다. 천연 화학적 라이게이션은 첨가된 촉매제인 외인성 티올의 존재 하에 티올(염)-티오에스테르 교환 반응이 자유 가역적이므로 매우 정교한 위치선택적 반응이다. 수득한 최종 라이게이션 산물의 고효율은 하나/모두 부분(segments) 내 내부 시스테인 잔기의 존재에서, 사용된 반응 조건 하의 2차(S-to-N 아실 이동) 아마이드-형성 단계의 비가역성에 기인한다. NCL의 화학선택성은 둘 중 하나의 단백질(또는 펩타이드) 내 존재하는 다른 기능기(산 또는 염기 아미노기, 페놀성 수산기 등)와의 반응에 의한 어떠한 부산물을 형성하지 않는다.

- [0025] 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치에 이용되는 기관은 메모리 디바이스에서 이용되는 어떠한 것도 포함한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 기관은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO<sub>2</sub> 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 기관은 금속이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 기관은 금(Au) 기관이다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 “금 기관”은 금으로 표면 코팅된 기관을 포괄하는 의미를 갖는다.
- [0028] 기관 상에 시스테인 변형 단백질을 고정화 하는 방법을 구체적인 일 실시예를 참조하여 설명하면 다음과 같다:
- [0029] 우선, 기관, 바람직하게는 금 기관을 오븐에서 어닐링 하고, 피라나 용액을 이용하여 세척한다. 이어, 금 기관에 시스테인 변형된 단백질을 상기 기관의 표면에 뿌리고 단백질이 기관 상에서 SAM을 형성하도록 방치하여 단백질이 고정된 기관을 얻는다.
- [0030] 기관 상에 시스테인 변형 단백질을 고정화 하는 경우, 단백질 용액의 최적 농도는 1-100 μM, 1-50 μM 또는 1-20 μM이다. 또한, 고정화에 대한 최적 시간은 2-10시간, 3-9시간 또는 4-8시간이다.
- [0031] 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치는 전위의 인가에 의해 작동된다.
- [0032] 본 발명은 기관, 바람직하게는 금 기관의 표면에 티올기, 즉 시스테인 잔기가 도입된 금속 단백질이 결합된 융합 단백질 분자를 자기조립 시키고, 인가되는 전압에 따라 나타나는 단백질 고유의 전자 전달 특성을 이용하여 나노 단위의 정보 저장 장치로 응용할 수 있음을 특징으로 한다.
- [0033] 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치가 전기적으로 작동되는 경우, 본 발명의 바이오메모리 디바이스는 가역적으로 변화되고 전기적으로 읽을 수 있는(readable) 전기적 장치로서, 다음과 같이 구성될 수 있다:
- [0034] 이 전기적 장치는 기관을 포함한다. 이 기관은 상술한 바와 같으며, 하기의 실시예에서는 전기적으로 대전되는 금 표면 코팅된 기관이다. 상기 기관 상에 산화환원-활성층(redox-active layer)이 이루어진다. 본 발명에서는 산화환원 활성층으로서, 산화환원능을 가지는 금속 단백질이 결합된 융합 단백질의 SAM이 이용된다. 상기 산화환원 활성층은 재조합 단백질에 의해 일정한 전자적 상태, 예컨대 산화상태 또는 환원상태에 놓이게 된다. 상기 산화환원-활성층에 전극이 연결된다. 상기 기관 또는 전극, 또는 기관과 전극 모두에 연결된 전기장원(electric field source), 예컨대 전압공급 유니트가 본 발명의 디바이스에 포함된다. 이 전기장원에 의해 공급된 전압 또는 전자빔에 의해 전자의 흐름이 유도되며, 이에 의해 메모리 특성을 나타낸다.
- [0035] 따라서 전기적으로 본 발명의 바이오메모리 장치를 구축하는 경우, 본 발명의 디바이스는 (i) 기관, (ii) 산화환원-활성층으로서 상기 기관 상에 고정화 되어 있고 산화환원능을 가지는 시스테인 도입된 재조합 단백질을 포함하는 융합 단백질의 SAM, (iii) 상기 산화환원-활성층에 연결된 전극, 및 (iv) 상기 기관 및/또는 전극에 전압 또는 전자빔을 공급하는 전기장원(electric field source)을 포함한다.
- [0036] 한편, 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치를 전기화학적으로 구현하는 구체적인 실시예를 참조하여 설명하면 다음과 같다:
- [0037] 본 발명은 전기화학적 방법으로 인가(applying) 전압을 조절, 고정된 단백질의 산화와 환원 상태를 변화시키는 것이 가능한 정보 저장 디바이스에 관한 것이다. 단백질 박막이 형성된 기관은 전해질 용액, 예컨대 HEPES 전해질 안에 배치된다. 기관은 작업 전극으로 포텐티오스택에 연결되어 작동하고 전해질 안에 기준 전극(예컨대, Ag/AgCl)과 상대 전극(예컨대, Pt)가 삽입된다. 기준 전극은 포텐티오스택이 전압을 스윕하는 경우 작업 전극의 전위 변화를 읽어내는 기준이 된다. 카운터 전극은 포텐티오스택의 전위 조절에 의해 전자가 흐르게 되는 통로다. 이와 같은 3 전극 시스템은 전기화학에서 가장 많이 구성하는 시스템 중의 하나인 것으로 알려져 있다. 상기 간단한 전기화학 시스템에서 순환전류전압법을 통해 간단한 전압-전류 곡선을 얻는다.
- [0038] 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치는 9 가지 경우의 정보를 저장할 수 있다.

- [0039] 본 발명의 실시예에 따르면, 전류에 따른 상기 이중상 바이오메모리 장치를 구성하는 용합 단백질에 전자의 유입 및 유출로 인해 ‘1020 논리 패턴’을 달성 할 수 있다. 상기 ‘1020 논리 패턴’은 도 4f에 나타낸 바와 같이, 실험에 따른 ‘0’, ‘1’ 또는 ‘2’의 비트를 나타냄으로써,  $3^2=9$ 의 경우의 정보를 저장할 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 용어 ‘패러데이(faradaic) 전류’는 전극의 어떠한 화학 물질의 산화 또는 환원에 의해 발생된 전류를 의미한다(IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book") (1997). Online corrected version: (2006) "faradaic current").
- [0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, (a) 산화환원능을 갖는 용합 단백질을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 용합 단백질을 직접 기판에 고정시키는 단계를 포함하는 이중상 바이오메모리 장치의 제조방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 방법은 상기 이중상 바이오메모리 장치를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

**발명의 효과**

- [0043] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0044] (a) 본 발명은 이중상 바이오메모리 장치 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [0045] (b) 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치는 단일 장치 내 다양한 정보를 저장할 수 있다.
- [0046] (c) 본 발명의 이중상 바이오메모리 장치는 앞으로의 단일 분자-기반 이중상 정보 저장 시스템을 개발하기 위한 강력한 대안이 될 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0047] 도 1은 천연 화학적 라이게이션(Native Chemical Ligation; NCL)의 반응 과정을 나타낸다.
- 도 2는 제조합 아주린-SMCC-미오글로빈 결합을 위한 결합 방법을 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 이중상 바이오메모리의 (a) 도식화 구조; (b) 실제 구조; (c) 예상 기능; 및 (d) 기작을 나타낸다.
- 도 4a 및 4b는 (a) SDS-PAGE 및 (b) UV-VIS 분광기(파란색 선: 제조합 아주린, 갈색 선: 미오글로빈, 분홍색 선: Azu-Myo 용합 단백질)를 통해 확인한 Azu-Myo 용합 단백질 결합을 나타낸다.
- 도 5a 내지 5g는 (a-c) 제조합 아주린, MAA 층 상의 자가-조립된 미오글로빈 및 Azu-Myo 용합 단백질의 표면형태; (d) 제조합 아주린, MAA 층 상의 자가-조립된 미오글로빈 및 Azu-Myo 용합 단백질의 표면 거칠기 분석; 및 (e-g) 제조합 아주린, MAA 층 상의 자가-조립된 미오글로빈 및 Azu-Myo 용합 단백질의 라만 스펙트라를 타낸다.
- 도 6a 내지 6f는 (a) Azu-Myo 용합 단백질의 순환 볼타모그램; (b) Azu-Myo 용합 단백질의 산화-환원 전위값; (c) 0.2초의 펄스폭을 갖도록 인가된 2쌍의 산화 전위(쓰기) 및 환원 전위(지우기); (d) 0.8초(1 주기)의 총 지속시간 동안 측정된 유도 전류 반응; (e) 24초(30 주기)동안의 이중상 바이오메모리 실험의 유도 전류 반응; 및 (f) 이러한 조합에 의해 저장된 비트에 대한 2 실험으로부터 얻은 결과로, 이는 9 가지 경우의 정보를 저장할 수 있다.
- 도 7a 내지 7b는 MAA-조작 (a)금 전극 상에 자가-조립된 미오글로빈 및 (b)금 전극 상의 시스템-조작 아주린의 순환 볼타모그램을 나타낸다.
- 도 8은 MAA-조작 금 전극 상에 자가-조립된 제조합 아주린-미오글로빈 용합 단백질의 순환 볼타모그램을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는

것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] 실시예

[0050] 실험재료 및 실험방법

[0051] 실험재료

[0052] 슈도모나스 애루지노사(*pseudomonas aruginosa*) 유래 재조합 아주린(Azurin; Azu)을 공지된 방법에 따라 발현 및 정제하였다(Min et al., 2008, Kim et al., 2010). 말 심장 유래 미오글로빈(Myo)은 시그마-알드리치 사(미국)로부터 구매하였다. sulfo-SMCC[sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate]는 피어스 사(미국)로부터, HEPES[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], DMF(N,N-Dimethylformamide), MAA(2-mercaptoacetic acid) 및 APTES[(3-aminopropyl)triethoxysilane]은 시그마-알드리치 사(미국)으로부터 구매하였다. SERS 실험을 위한 금 나노입자(Gold nanoparticles; GNPs, 60 nm)는 BBI 사(영국)로부터 구매하였다. 작동 전극으로써 바이오메모리 장치를 제작하였다. AFM, SERS 및 전기화학 실험을 위한 금 기질(Au, 200 nm)/Cr(2 nm)/SiO<sub>2</sub> 웨이퍼 및 ITO 기질은 G-mek 사(대한민국)로부터 구매하였다(Lee et al., 2010).

[0053] 실험방법

[0054] Azu-Myo 융합 단백질의 합성 및 합성 단백질의 고정

[0055] 재조합 아주린-SMCC-미오글로빈 융합 단백질을 고효율로 수득하기 위해, 다른 단계 및 전략의 2가지 결합 방법을 시도하였다.

[0056] 결합 방법 1: 시스테인-조작 아주린(sulfhydryl-containing biomolecule)을 sulfo-SMCC와 반응시켜 티오에테르(thioether) 결합이 형성되게 하였다. 다음, 재조합 아주린-sulfo SMCC에 미오글로빈을 첨가하여 아마이드(amide) 결합이 형성되게 하였다. 결과적으로, 재조합 아주린-SMCC-미오글로빈 결합체를 제조하였다.

[0057] 결합 방법 2: 미오글로빈의 N-말단 아민기와 sulfo-SMCC와 결합하여 아마이드 결합을 형성시키고 시스테인-조작 아주린(sulfhydryl-containing biomolecule)을 첨가하여 말레이미드-활성(maleimide-activated) 재조합-sulfo SMCC와 결합하여 안정적인 티오에테르 결합이 형성되게 한다. 결과적으로, 재조합 아주린-SMCC-미오글로빈 결합체를 제조하여 수득하였다.

[0058] 이러한 결합 방법 1 및 2는 도 2에 나타내었다.

[0059] 수득한 결합체를 수집하고 겔 한외 거르기(gel ultrafiltration)로 정제하였다. MWCO 3k 아미콤 초원심분리(밀리포어, 미국)로 한외 거르기 하여 Sulfo-SMCC 태깅된 단백질을 정제하고 결합하지 않은 SMCC를 제거하였다. 결합 완충액(20 mM Tris, 50 mM NaCl 및 1 mM EDTA pH 7.0) 및 탈염 컬럼(PD-10)으로 정제된 단백질을 투석하였다. 수집한 Azu-Myo 융합 단백질을 반복 한외거르기로 농축하였다.

[0060] 제조된 Azu-Myo 융합 단백질을 고정시키기 위해, 준비한 금(Au) 기질을 기존의 피란하 용액[30 vol% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(대정화학, 대한민국) 및 70 vol% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(대정화학, 대한민국)]으로 60℃에서 5분 동안 세척하여 표면 잔기를 제거하였다. 다음, 금 기질을 탈이온수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 금 기질 상에 20 μl Azu-Myo 융합 단백질 용액(10 μM)을 6시간 동안 떨어뜨려(dropped), 상기 Azu-Myo 융합 단백질의 재조합 아주린의 시스테인이 자가-조립(self-assembly)하여 공유결합을 형성하도록 하였다.

[0061] Azu-Myo 융합 단백질의 표면 특성 조사

[0062] 제조된 Azu-Myo 융합 단백질, 재조합 아주린 및 미오글로빈/MAA 층의 표면 형태를 상온에서 AFM(Atomic Force Microscopy; 디지털 인스트루먼트 나노스코프(R) IV, 미국)으로 조사하였다. AFM 이미지를 230-305 kHz의 공진 주파수(resonant frequency)를 갖는 0.01-0.25 Ωcm 안티몬-도프드 Si 팁(RTESP, 버루커, 미국)을 사용하여 모니터링하였다. 이미지의 크기는 500 nm×500 nm이고, 표면 형태의 측정에 사용된 주사속도(scan rate)는 1.0 Hz이다. 각 이미지의 표면 거칠기 및 부분 분석을 나노스코프 소프트웨어의 오프라인 방법을 이용하여

분석하였다. 거칠기 평균,  $R_a$ 는 표면 프로필의 높이의 절대값의 산술평균으로, 상기  $R_a$ 는 진폭 거칠기 파라미터로 가장 널리 쓰인다. 또한, 거칠기 제곱평균(root mean square; RMS),  $R_q$ 는 높이의 표준편차이다. 최대 거칠기  $R_{max}$ 는 표면의 최고 피크이다(Yagati et al., 2013).

[0063] SERS 측정을 위해, ITO-코팅 유리 기질(G-mek, 대한민국)을 1% 트리톤 X-100, DIW 및 에탄올에서 연속하여 30분 동안 초음파 처리하여 세척하였다. 세척 후, 준비한 ITO 기질을  $O_2$  플라즈마에 5분 동안 노출하여 친수성 표면을 제조하였다. 다음, 실란화(silanization) 하기 위해 ITO 기질 상에 100  $\mu$ l 5% APTES[(3-aminopropyl)triethoxysilane](in 95% 에탄올)을 2시간 동안 상온에서 떨어뜨렸다. 에탄올로 세척한 후에, APTES-조작 ITO 기질을 99°C에서 20분 동안 가열하여 유기실란(organosilane) 분자를 큐어링하였다. 다음, APTES-조작 ITO 표면 상에 60 nm GNP를 떨어뜨리고 24시간 동안 4°C에서 항온반응하였다. 마지막으로, GNP-조작 기질을 탈이온수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하여 결합하지 않은 GNP를 제거하였다. SERS 측정을 위해, 제조된 Azu-Myo 융합 단백질, 제조합 아주린 및 미오글로빈/MAA를 GNP 표면 상에 떨어뜨렸다(El-Said et al., 2011).

[0064] 이중상 바이오메모리의 전기화학적 실험 셋업

[0065] 고안된 이중상 바이오메모리 셀을 전기화학-시스템에서 조사하였다. 융합 단백질 층-고정 금 기질을 작동전극으로 사용하였다. Ag/AgCl 기준전극 및 Pt 상대전극을 CHI660A 전기화학 워크스테이션(CH 인스트루먼트, 미국)에 사용하였다.

[0066] 모든 전기화학적 실험은 10 mM HEPES 완충액 내에서 실시하였다. 10 mM HEPES 완충액(pH 7.0) 내에서 Azu-Myo 융합 단백질이 고정된 Au 기질에 대하여 0.6 내지 -0.1 V의 전위 범위 내 50 mV/s의 스캔율의 Ag/AgCl 전극으로 순환 전압전류법(cyclic voltammetry)을 실시하였다.

[0067] 실험 결과 및 토론

[0068] SDS-PAGE 및 UV-VIS를 이용한 Azu-Myo 융합 단백질의 확인

[0069] Azu-Myo 융합단백질을 수득하기 위해, NCL(Native Chemical Ligation) 방법을 이용하여 제조합 아주린 및 미오글로빈을 sulfo-SMCC로 결합시켰다. 12% 변성 SDS-PAGE 분석 결과는 Azu-Myo 융합 단백질이 제조되었음을 보여준다(도 4a). 1열은 크기 마커이고, 2열 및 3열은 각각 제조합 아주린(14.6 kDa) 및 미오글로빈(17.0 kDa)이다. Azu-Myo 융합 단백질을 4열 및 5열에 나타내었다. 4열은 제조합 아주린-SMCC-미오글로빈이고, 5열은 미오글로빈-SMCC-제조합 아주린이다. 4열의 제조합 아주린-SMCC-미오글로빈 결합체는 SDS-PAGE 겔 상에서 밴드의 지연된 이동을 나타내었다(31.6 kDa). 그러나, 5열의 미오글로빈-SMCC-제조합 아주린 결합체는 제조합 아주린-SMCC-미오글로빈과 비교하여 더 지연된 이동을 나타내었다(34.0 kDa). 이러한 밴드 사이즈는 미오글로빈 이량체와 유사하였다(약 35.4 kDa). 이러한 이유로 Azu-Myo 융합단백질과 미오글로빈-SMCC-제조합 아주린을 얻기 쉽지 않다. 결과적으로, 결합 방법 1에 따라, 2작용기 링커인 sulfo-SMCC는 제조합 아주린과 미오글로빈 분자 사이를 잘 연결하였다. 이러한 방법에 따라, Azu-Myo 융합 단백질을 제조하였다.

[0070] UV-VIS 흡수 스펙트럼으로 Azu-Myo 융합 단백질, 제조합 아주린 및 미오글로빈을 비교 분석하였다. 도 4b는 제조합 아주린(파란색선), 미오글로빈(밤색선) 및 Azu-Myo 융합 단백질(분홍색선)의 UV-VIS 스펙트라를 나타낸다. 제조합 아주린은 산화된 구리 이온으로 인해 파란색을 띤다. 상기 구리는 아주린 분자 내 5 아미노산 잔기(Gly45, His46, Cys112, His117 및 Met121)와 630 nm에서 강한 흡광도를 나타내는 독특한 기하학적 구조로 있다(Min et al., 2008; Lee et al., 2011). 630 nm에서의 흡광도는 폴딩된 제조합 아포(apo)-아주린에 의해 구리 이온이 흡수됨을 확인해준다. 야생형 미오글로빈의 경우, UV-VIS 스펙트럼은 418 nm에서 소렛 피크(Soret peak)를 나타낸다. 상기 소렛 피크의 강제는 미오글로빈 내 헴(heme) 기 내 공유적으로 결합한 물과 관련이 있다(Li et al., 2003). 또한, Azu-Myo 융합 단백질의 경우, 흡수 스펙트라는 제조합 아주린과 미오글로빈이 조합된 스펙트라를 보여준다. UV-VIS 스펙트라는 416 nm에서의 소렛 피크 및 628 nm에서 강한 흡수의 두가지 특징을 가리킨다(도 4b; 분홍색 선). 이러한 분석에 근거하여, Azu-Myo 융합 단백질이 잘 제조되었고, 이는 금속 이온을 가짐을 의미한다.

[0071] AFM 및 SERS에 의한 Azu-Myo 융합 단백질의 표면 조사

[0072] 제조된 Azu-Myo 융합 단백질 표면을 조사하기 위해, AFM 측정을 실시하였다. 제조합 아주린 표면의 경우, 금 기질 상에 아주린의 작은 덩어리가 추가적인 링커 없이 잘 배향(orientation)되었다. 평균 덩어리의 크기는 약 40-55 nm이다(도 5a). 그러나, MAA-조작 금 기질 상에 미오글로빈 자가-조립의 경우, 미오글로빈 분자는 MAA-조작 금 표면 상에 잘 정돈되어 있었다. 단백질 덩어리의 크기는 약 20-35 nm이다(도 5b). 미오글로빈 덩어리는 제조합 아주린 덩어리보다 작았다. 더욱이, 어떠한 링커 없이 금 기질 상에 고정된 Azu-Myo 융합 단백질의 경우, 융합단백질은 금 기질 상에 잘 자가-조립 되었다. 또한, Azu-Myo 융합 단백질 덩어리의 크기는 약 20-40 nm이다(도 5c). 짐작컨대, 상기 아주린 분자는 시스테인기에 의해 금 기질 상에 고정되므로 미오글로빈 분자가 제조합 아주린 분자의 위에 위치함을 의미한다. 결과적으로, 금 기질 상에 Azu-Myo 융합 단백질이 잘 조직되었다.

[0073] 또한, 제조합 아주린, MAA 층 상에 자가-조립된 미오글로빈 및 Azu-Myo 융합 단백질의 표면 거칠기를 나노스코프 소프트웨어로 오프라인 부분 분석하여 도 5d에 나타내었다. 제조합 아주린의 경우,  $R_a$  값은  $2.042 \pm 1.075$  nm이고,  $RMA R_q$ 는  $2.407 \pm 1.199$  nm,  $R_{max}$ 는  $8.502 \pm 3.671$  nm이다. 또한, MAA 층 상에 자가-조립된 미오글로빈의 경우,  $R_a$ ,  $R_q$  및  $R_{max}$ 는 각각  $0.472 \pm 0.092$  nm,  $0.585 \pm 0.108$  nm 및  $1.926 \pm 0.291$  nm이다. 미오글로빈의 경우, 제조합 아주린 분자와 비교하여 각 거칠기 값이 감소하였다. 이는 미오글로빈 덩어리가 덜 거칠고 심곡으로 나뉜 평균 직경 20-40 nm의 작은 덩어리로 이루어져 있기 때문이다. 또한, Azu-Myo 융합 단백질의 경우,  $R_a$ ,  $R_q$  및  $R_{max}$ 는 각각  $0.557 \pm 0.108$  nm,  $0.685 \pm 0.121$  nm 및  $2.184 \pm 0.517$  nm이다. 미오글로빈과 비교하여 거칠기 값이 약간 증가하였다. 이는 미오글로빈이 제조합 아주린 분자 위에 위치함을 의미한다. 이러한 결과에 근거하여, 자가-조립을 통해 금 기질에 표면에 Azu-Myo 융합 단백질이 잘 배향됨을 결론지을 수 있다.

[0074] 도 5e 내지 5g는 각각 제조합 아주린 층, MAA 층 상에 자가-조립된 미오글로빈 및 Azu-Myo 융합 단백질 자가-조립 층의 SERS 분석을 나타낸다. 제조합 아주린의 라만(raman) 스펙트라는 다른 코디네이트와 혼합된 Cu-N(His) 스트레칭과 관련된 정상 모드로 보고된  $263 \text{ cm}^{-1}$  부분에 근접한 것을 모니터하였다(Webb et al., 1997). 또한,  $340 \text{ cm}^{-1}$  부분에 근접한 강한 밴드는 Cu-S 스트레칭과 관련된 모드이다. 아주린의 라만 스펙트라는 C-S(cys) 스트레칭과 관련된 피크인 거의  $749 \text{ cm}^{-1}$ 로 측정되었다(도 5e)(Webb et al., 2000). 제조합 아주린의 라만 스펙트럼은 제조합 아주린이 GNP-조작 ITO 상에 잘 배향됨을 보여준다. 미오글로빈의 경우,  $\nu(\text{Fe-O})$  모드와 관련된  $548 \text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 피크가 관찰되었고,  $578 \text{ cm}^{-1}$ 에서 관찰된 피크는  $\nu(\text{Fe-O})$  스트레칭과 관련된다(도 5f)(Mak et al., 2008).  $1169 \text{ cm}^{-1}$ 에 근접한 강한 피크는 항-대칭  $\nu(\text{pyr half-ring})$ 와 관련이 있다(Li et al., 2003). 따라서, GNP-코팅 ITO 상에 미오글로빈/MAA 이중층이 잘 배향되었다. 일반적으로 Azu-Myo 융합 단백질의 경우, Azu-Myo의 라만 스펙트럼은 미오글로빈과 유사하였다(도 5g). 그럼에도 불구하고, 다른 코디네이트와 혼합된 Cu-N(His) 스트레칭과 관련된  $264 \text{ cm}^{-1}$ 에 근접한 강한 피크 및 Cu-S 스트레칭과 관련 있는  $343 \text{ cm}^{-1}$ 에 근접한 강한 피크를 확인하였다. 이러한 특징들은 제조합 아주린과 관련이 있다.  $548 \text{ cm}^{-1}$  및  $580 \text{ cm}^{-1}$ 의 2 피크가 관찰되었다. 상기 2 피크는 미오글로빈에 의한  $\nu(\text{Fe-O})$  모드 및  $\nu(\text{Fe-O})$  스트레칭과 관련이 있다. 이러한 결과에 근거하여, GNP-코팅 ITO 표면 상에 Azu-Myo 융합 단백질이 잘 고정되어 금 표면 상에 Azu-Myo 융합 단백질의 형성됨을 확인하였다.

[0075] Azu-Myo 융합 단백질의 전기화학적 특징

[0076] 이중상 메모리 기능을 수행하기 위한 산화 및 환원 전위를 확인하고자 순환 전압전류법(Cyclic Voltammetry; CV)을 통해 Azu-Myo 융합 단백질의 본래 산화환원 특성을 조사하기 위한 Azu-Myo 융합 단백질의 전기화학적 특징을 확인하였다. 실험 전에, 각 금속 단백질의 다른 내부 금속이 Azu-Myo 분자의 전기화학적 특징에 영향을 줄 것이라고 가정하였다. 상기 가정을 확인하기 위해, 제조합 아주린 및 미오글로빈의 각 산화환원 특징을 CV로 측정하였고, 결과를 도 6 및 7에 나타내었다. 5종의 조작 Azu-Myo 샘플의 환원 전위(Reduction Potential; RP) 및 산화 전위(Oxidation Potential; OP)를 결정하기 위해 CV 실험을 반복하였다. 결과적으로 2쌍의 산화환원 피크를 명확하게 확인할 수 있었다.



모리 장치는 입력 전위의 쌍을 조절하는 이중상 분자 정보 저장 시스템으로서 잘 구축되었다.

[0083] **결론**

[0084] 본 발명에서, 천연 화학적 라이게이션(Native Chemical Ligation; NCL)을 이용하여 융합 단백질로 구성된 이중상 바이오메모리 장치를 제조하였다. 이중상 바이오메모리 장치의 일차적인 장점은 종래의 정보-저장 장치와 비교하여 데이터 밀도를 증가시키는 것이다. 이차적인 장점으로, 융합 단백질의 새로운 기능성에 대한 새로운 생체 적합 물질 조합을 보여준다. 이러한 장점은 바이오메모리 장치의 요소로서 융합 단백질이 적용될 수 있게 한다. 이러한 목적을 위해, 천연 화학적 라이게이션 방법에 의해 용이하게 제조할 수 있는 재조합 아주린 및 미오글로빈으로 구성된 신규한 융합단백질을 고안하였다. 융합 단백질이 잘 제조되었음을 확인하였다. 다음, AFM 및 SERS를 이용하여 융합 단백질-조작 전극 표면을 확인하였다. 2 쌍의 산화-환원 전위 값을 얻기 위해, 순환 전압전류법을 실시하였다. 다음, MPCA로 이중상 바이오메모리 수행능력을 조사하였다. 제조된 장치로 2 비트의 정보를 성공적으로 조절하였다. 제조된 바이오메모리 장치는 단순성, 효율성 및 단일 장치에 2 비트의 정보의 조절할 수 있는 장점을 제공한다. 이는 앞으로의 단일 분자-기반 이중상 정보 저장 시스템을 개발하기 위한 강력한 대안이 될 것이다.

[0085] **참고문헌**

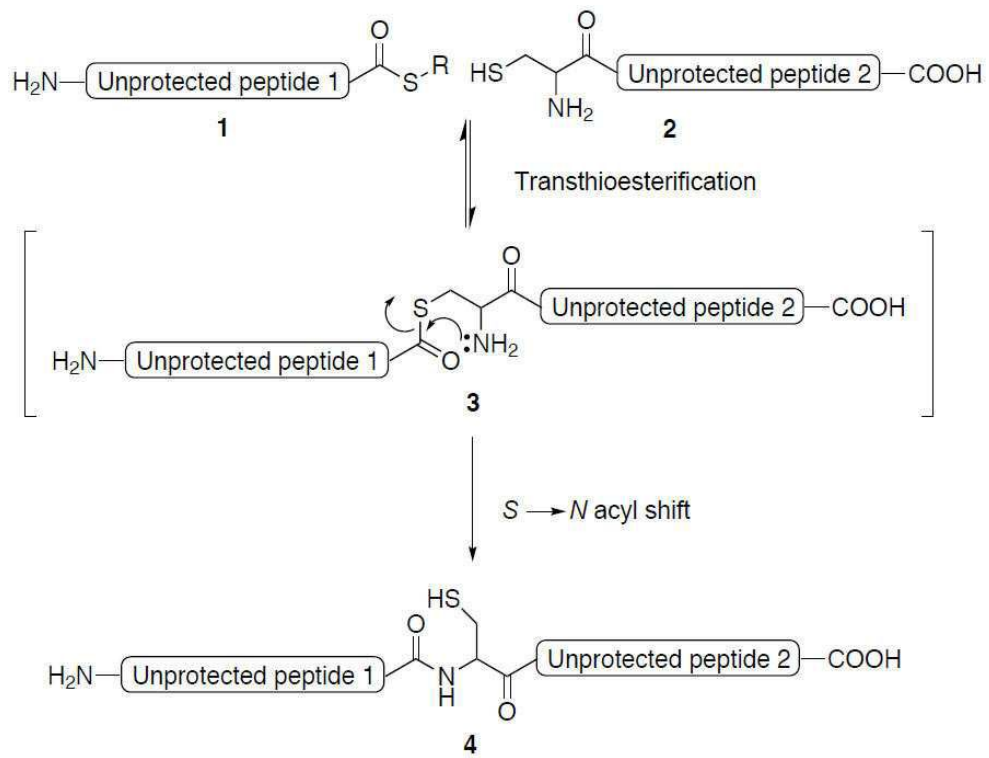
- [0086] Alessandrini, A., Salerno, M., Frabboni, S., Facci, P., 2005, Single-metalloprotein wet biotransistor. *Appl. Phys. Lett.* 86, 133902.
- [0087] Bartlett, P. N., 2008. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, First ed. Wiley, UK.
- [0088] Bertini, I., Sigel, A., Sigel, H., 2001, *Handbook on Metalloproteins*, First ed. CRC press, UK
- [0089] Choi, J. -W., Nam, Y. -S., Park, S. J., Lee, W. H., Kim, D., Fujihara, M., 2001. Rectified photocurrent of molecular photodiode consisting of cytochrome c/GFP hetero thin films. *Biosens. Bioelectron.* 16, 819-825.
- [0090] Choi, J. -W., Oh, B. -K., Kim, Y. J., Min, J., 2007. Protein-based biomemory device consisting of the cysteine-modified azurin. *Appl. Phys. Lett.* 91, 263902.
- [0091] Dawson, P. E., Kent, S. B. H., 2000. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Ann. Rev. Biochem.* 69, 923-960.
- [0092] El-Said, W. A., Kim, T. -H., Kim, H., Choi, J. -W., 2011. Analysis of intracellular state based on controlled 3D nanostructures mediated surface enhanced Raman scattering. *PLoS One* 6, e15836.
- [0093] Hermanson, G. T., 2008. *Bioconjugate Techniques*, second ed. Elsevier, USA.
- [0094] Holm, R. H., Kennepohl, P., Solomon, E. I., 1996. Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chem. Rev.* 96, 2239-2314.
- [0095] Katz, E., Privman, V., 2010. Enzyme-based logic systems for information processing. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1835-1857.
- [0096] Kennedy, M. K., Gibney, B. R., 2001. Metalloprotein and redox protein design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 485-490.
- [0097] Kim, S. -U., Lee, J. -H., Lee, T., Min, J., Choi, J. -W., 2010. Nanoscale film formation of recombinant azurin variants with various cysteine residues on gold substrate for bioelectronic device. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 3241-3245.
- [0098] Lee, T., Kim, S. -U., Min, J., Choi, J. -W., 2010. Multilevel biomemory device consisting of recombinant azurin/cytochrome c. *Adv. Mater.* 22, 510-514.
- [0099] Lee, T., Min, J., Kim, S. -U., Choi, J. -W., 2011. Multifunctional 4-bit biomemory chip consisting of

recombinant azurin variants. *Biomaterials* 32, 3815-3821.

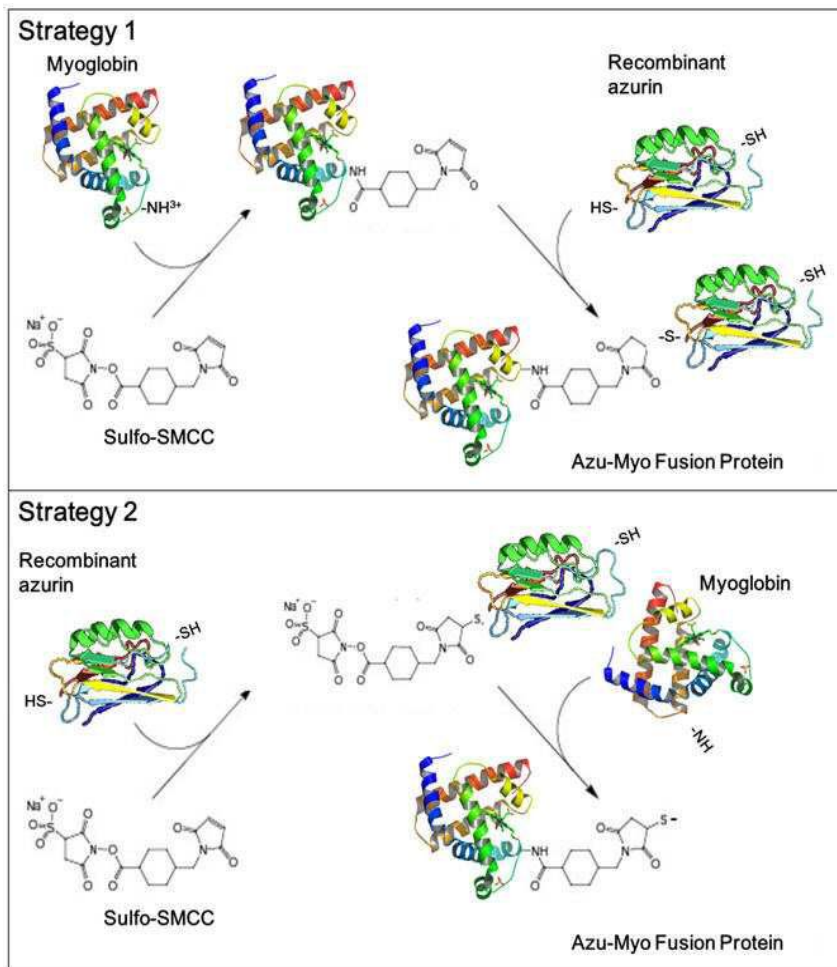
- [0100] Li, Q. C., Mabrouk, P. A., 2003. Spectroscopic and electrochemical studies of horse myoglobin in dimethyl sulfoxide. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 83-94.
- [0101] Mak, P. J., Kincaid, J. R., 2008. Resonance Raman spectroscopic studies of hydroperoxo derivatives of cobalt-substituted myoglobin. *J. Inorg. Biochem.* 102, 1952-1957.
- [0102] Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., Wieghardt, K., 2001. *Handbook of Metalloproteins*, First ed. Wiley, UK.
- [0103] Min, J., Choi, H. -G., Oh, B. -K., Lee, W. H., Paek, S. -H., Choi, J. -W., 2001. Visual information processing using bacteriorhodopsin-based complex LB films. *Biosens. Bioelectron.* 16, 917-923.
- [0104] Min, J., Kim, S. -U., Kim, Y. J., Yea, C. -H., Choi, J. -W., 2008. Fabrication of recombinant azurin self-assembled layer for the application of bioelectronic device *J. Nanosci.Nanotechnol.* 8, 4982-4987.
- [0105] Noy, A., 2011. *Bionanoelectronics*. *Adv. Mater.* 23, 807-820.
- [0106] Oh, B. -K., Kim, Y. -K., Park, K. W., Lee, W. H., Choi, J. -W. 2004. Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of *Salmonella paratyphi*. *Biosens. Bioelectron.* 19, 1497-1504.
- [0107] Petty, M.C., 2007. *Molecular Electronics From Principles to Practice*. First ed. Wiley: Chichester, UK.
- [0108] Webb, M. A., Kwong, C. M., Loppnow, G. R., 1997, Excited-state charge-transfer dynamics of azurin, a blue copper protein, from resonance Raman intensities, *J. Phys. Chem. B* 101, 5062-5069.
- [0109] Webb, M. A., Kiser, C. N., Richards, J. H., Bilio, A. J. D., Gray, H. B., Winkler, J. R., Loppnow, G. R., 2000. resonance Raman spectroscopy of Met121Glu azurin. *J. Phys. Chem. B* 104, 10915-10920.
- [0110] Willner, I., Katz, E., 2005. *Bioelectronics: From Theory to Applications*. First ed. Wiley-VCH, Germany.
- [0111] Yagati, A. K., Lee, T., Min, J., Choi, J. -W., 2012, Electrochemical performance of gold nanoparticlecytochrome c hybrid interface for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection. *Coll. Surf. B* 201, 161-167.
- [0112] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

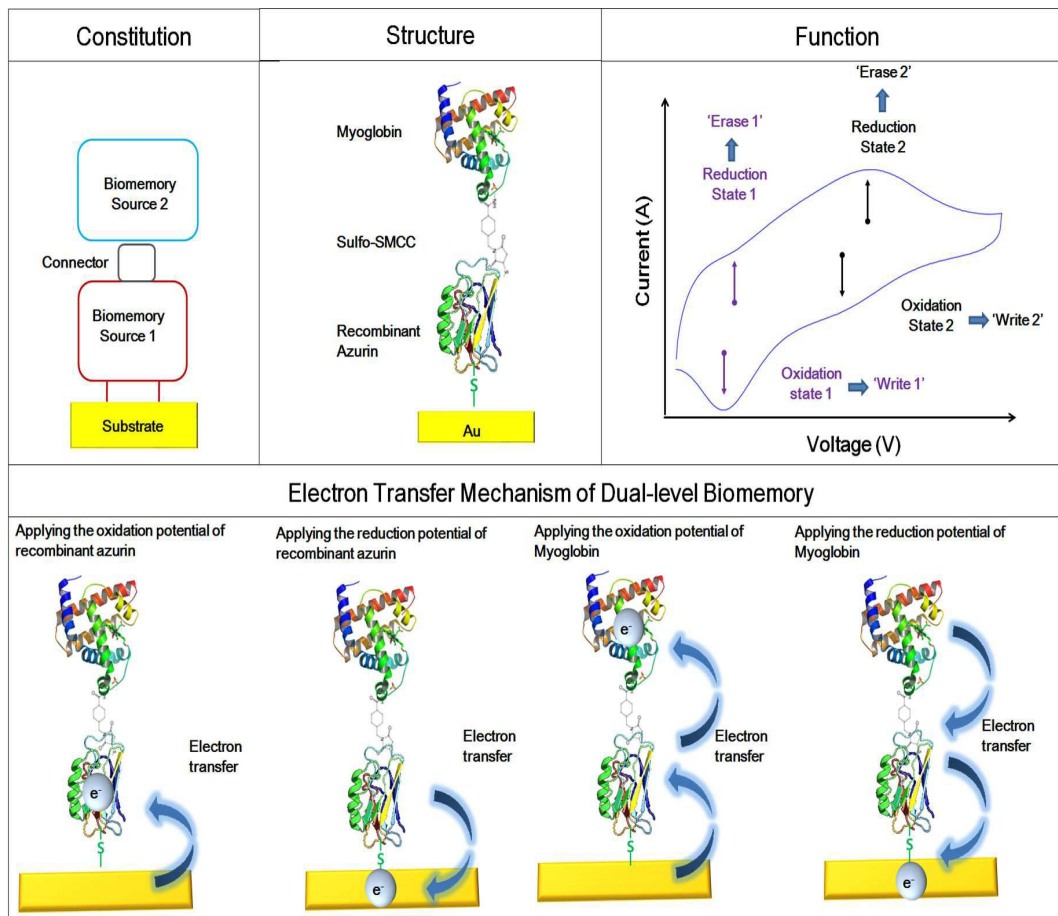
도면1



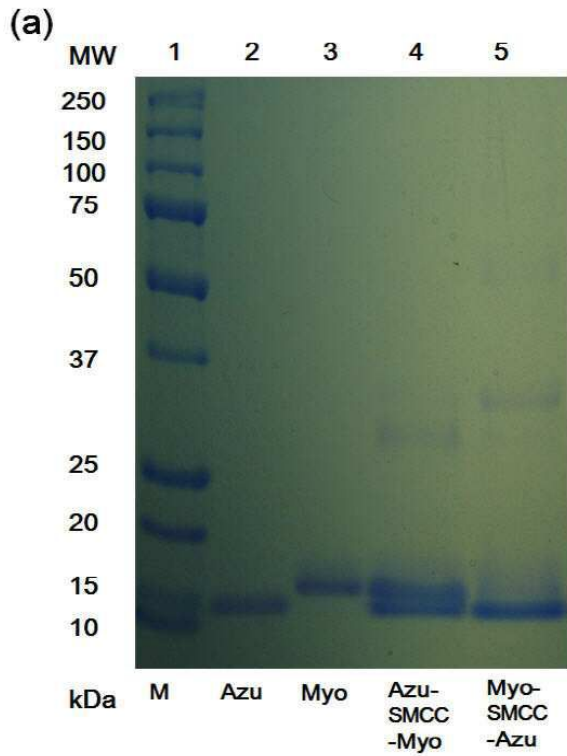
도면2



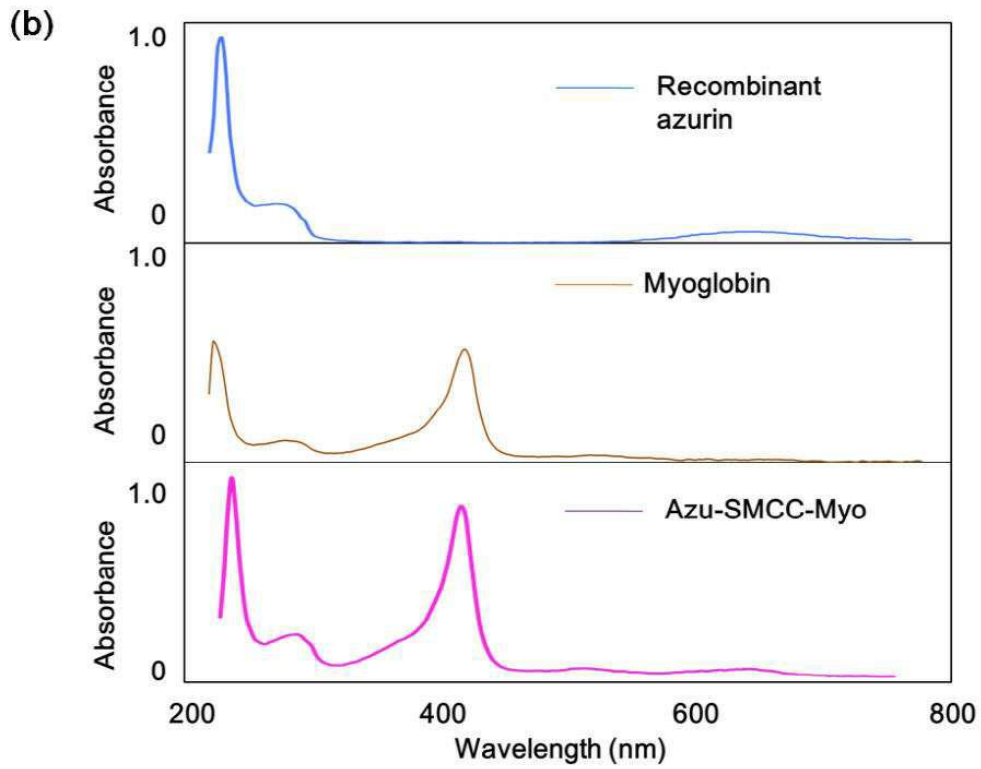
도면3



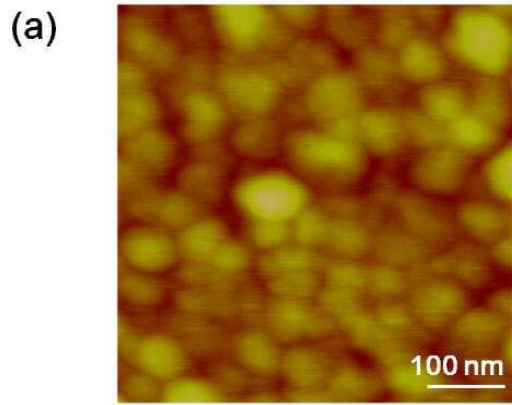
도면4a



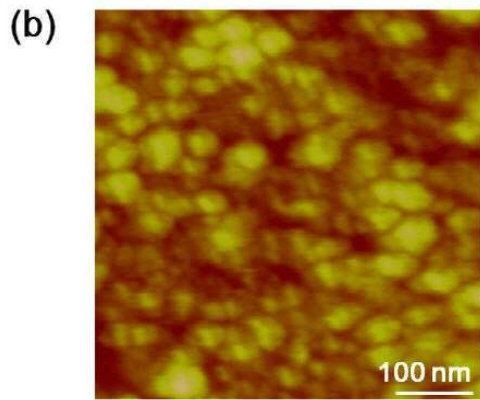
도면4b



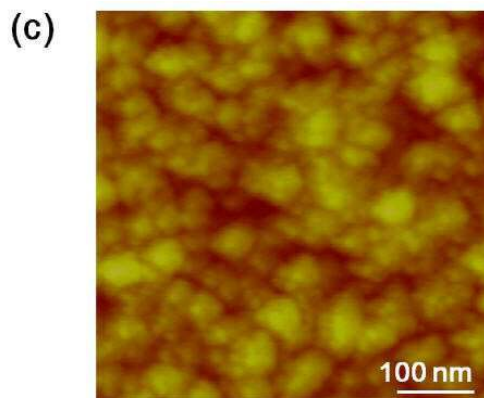
도면5a



도면5b



도면5c



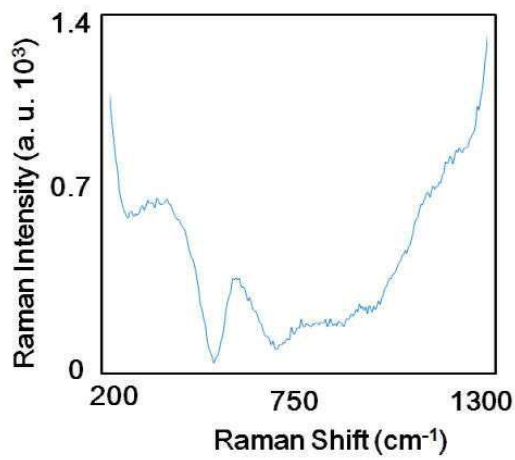
도면5d

(d)

|                             | Recombinant Azurin | Myoglobin     | Azu-Myo Fusion Protein |
|-----------------------------|--------------------|---------------|------------------------|
| Roughness average (Ra) (nm) | 2.042 ± 1.075      | 0.472 ± 0.092 | 0.557 ± 0.108          |
| RMS roughness (Rq) (nm)     | 2.407 ± 1.199      | 0.585 ± 0.108 | 0.685 ± 0.121          |
| Maximum Height (Rmax) (nm)  | 8.500 ± 3.671      | 1.926 ± 0.291 | 2.184 ± 0.517          |

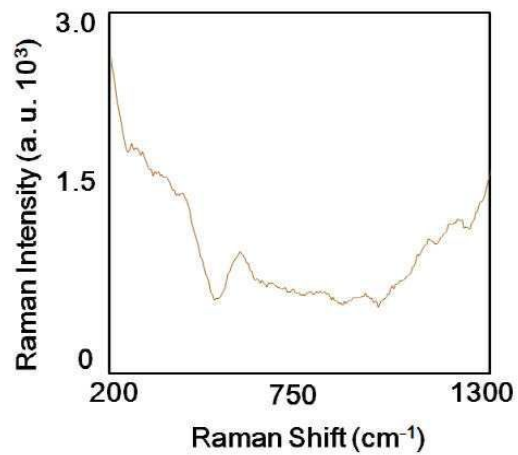
도면5e

(e)

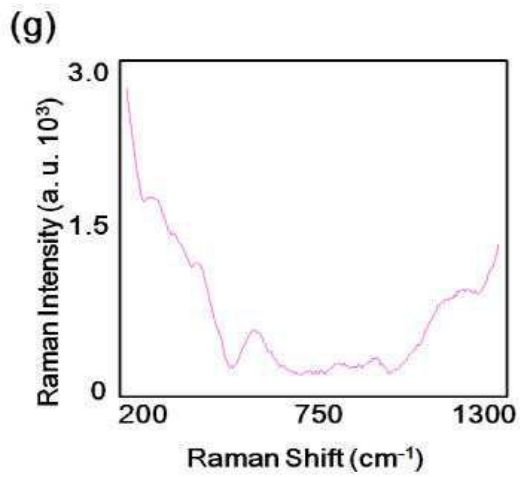


도면5f

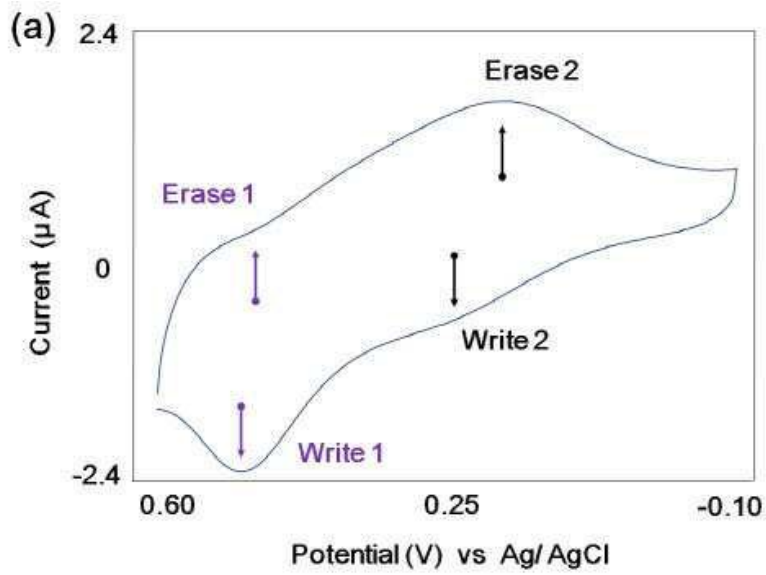
(f)



도면5g



도면6a

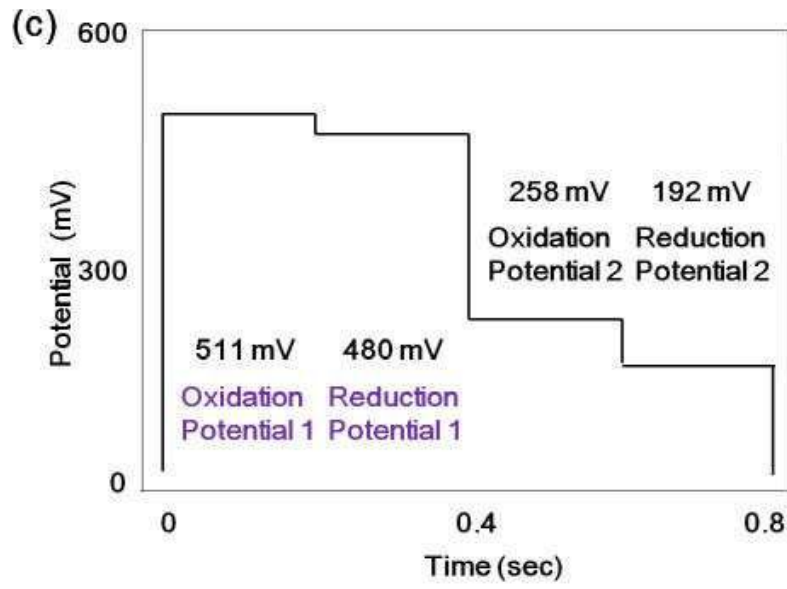


도면6b

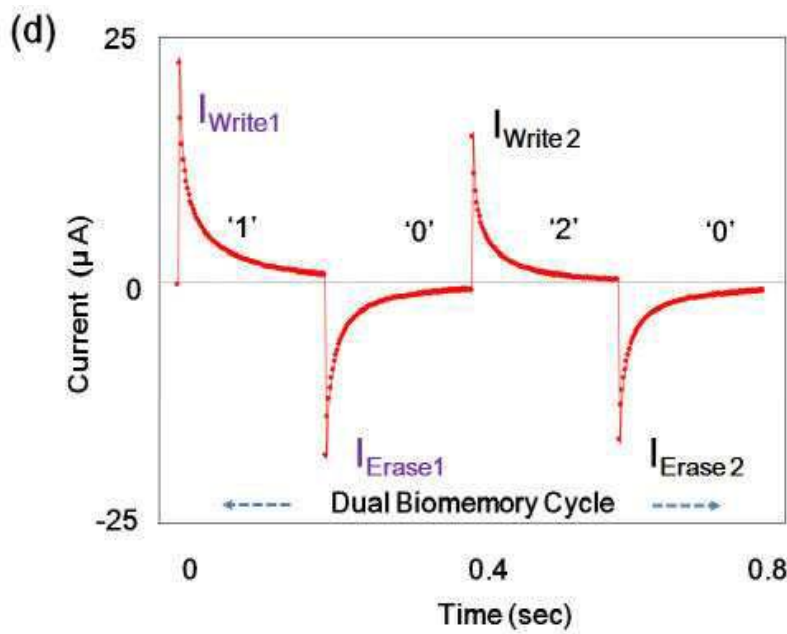
(b)

|                       | Oxidation Potential (mV) | Reduction Potential (mV) |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Azu-Myo Redox State 1 | 511                      | 482                      |
| Azu-Myo Redox State 2 | 258                      | 192                      |

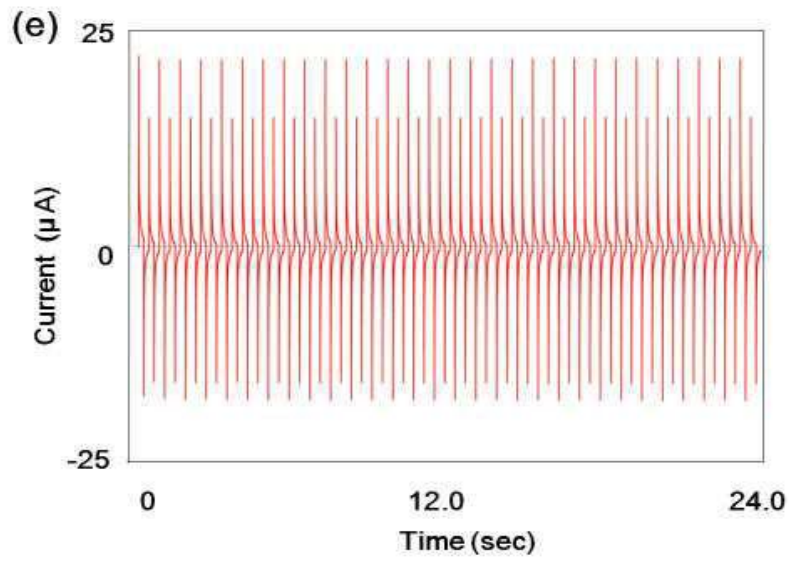
도면6c



도면6d



도면6e



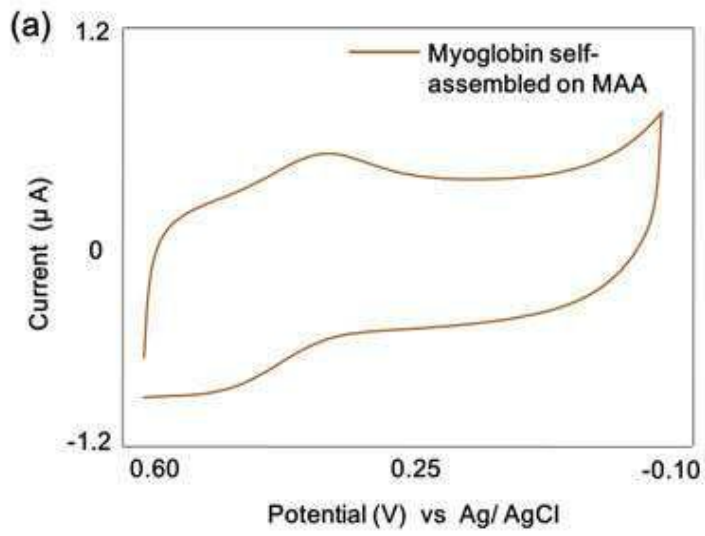
도면6f

(f)

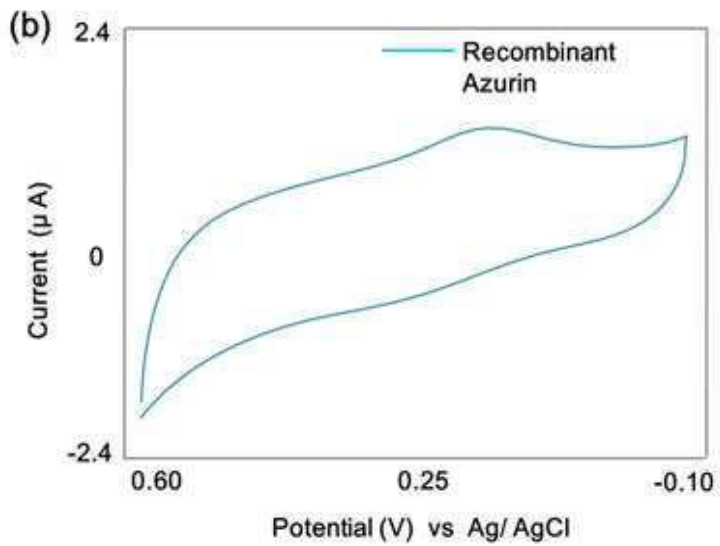
| Set \ Cell No. | Cell 1 (bit) | Cell 2 (bit) |
|----------------|--------------|--------------|
| Experiment 1   | 2            | 0            |
| Experiment 2   | 0            | 1            |

Possible Cases =  $3^2 = 9$  cases

도면7a



도면7b



도면8

