

## 전자물리학과

권남익 교수님 (p 1-p 15)

Photoresist와 Soft Lithography를 이용한 Microchannel 제작

유세기 교수님 (p 16-p 20)

임피던스 분석을 통한 AC구동형 OLED

## 생명화학

윤종화 교수님 (p 21- p 33)

Comparative study of corrosion inhibition of aluminum in acidic and neutral chloride media by some amino acids

## 생명공학과

박중찬 교수님 (p 34- p 42)

비천연 아미노산 인입 확인을 위한 보고자 벡터 시스템 제작

# Photoresist 와 Soft Lithography 를 이용한 Microchannel 제작<sup>1</sup>

차준호, 권남익<sup>2</sup>

Microchannel 은 micro-fluidic system 의 매우 중요한 구성 요소이다. Fluidic system 에서의 microstructures 은 UV lithography 를 이용하였고, positive PR 또는 negative PR 을 이용하여 만들 수 있다. microchannel 의 제조를 위해 negative PR 인 SU-8 을 사용하였으며 365nm 파장의 UV 를 사용하였다. 광학적으로 투명한 microchannel 은 유체의 흐름과 윤곽의 광학적 측정에 용이하다.

## 서 론

최근, 연구자들의 이목은 micro-fluidic system 내에서의 유체 특성에 연구에 관심을 가지고 있다. Microchannel 은 lab-on-a-chip 등 micro-fluidic system 에서 널리 사용되어지고 있다. 이를 통해 극미량의 샘플이나 시료만으로 기존의 실험실에서 할 수 있는 실험이나 연구 과정을 신속하게 대체할 수 있다. 이 칩을 이용하면 한 방울의 피로도 각종 암 진단이나 적혈구·백혈구의 세포 수 측정이 가능하다. 또한 micro-fluidic system 에서의 응용이 가능하여 생물학적 활성의 물리적 특성을 관측할 수 있고, 미세유동 제어를 위한 새로운 장치의 개발 등을 할 수 있다.

Microchannel 의 높은 quality 는 실험 결과를 검토하기에는 필수적이기 때문에, MEMS 기술에 바탕으로 한 microchannel 의 제작은 중요하였었다. 초기에, development 들은 대부분 보편적인 반도체 재료들과 기술들에 기초로 하였다.

---

<sup>1</sup> 이 논문은 2012학년도 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

<sup>2</sup> 한국외국어대학교 자연과학대학 전자물리학과 교수

그러나 거기에는 많은 제한들이 있었다. 예를 들어 micro-fluidic device 의 packing 과 testing, wet-etching 의 기하학의 한계, wafer 간의 불일치 그리고 wafer 의 불투명에 의한 측정의 어려움과 같은 많은 제한이 있었다.

최근에, 광학적으로 투명한 재료를 사용하여 제작한 microchannel 은 cell-counting 측정 시 매우 유용하다는 장점 때문에 polymer 를 사용한 microchannel 은 많은 주목을 받고있다. PDMS, Epon SU-8 과 같은 polymer 를 사용하는 몇 가지의 기술들은 제시되어지고 있는데, PDMS micro-modeling process 는 간단하고 빠르게 만들 수 있으며 비용이 적게 든다. 반면에 복잡한 3 차원의 microchannel 만들어내는 것은 쉽지 않다. 그리고 PDMS 는 탄성중합체이기 때문에 내압 또는 외력의 의해 microchannel 의 윤곽이 바뀌는 것이 가능하다. 따라서 Epon SU-8 과 PDMS 를 이용한 microchannel 은 쉽게 제작될 수 있으나 nm 단위의 정밀함은 만족시키지는 못한다는 단점이 있다.

## PDMS(polydimethyl siloxanes)의 특성

- ① Substrate 의 상대적으로 넓은 영역에 안정적으로 접착할 수 있다. 이는 평탄하지 않은 surface 에 대해서도 동일하게 만족할 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- ② interfacial free energy 가 낮다. 따라서, PDMS 로 다른 polymer 를 molding 할 때, 접착이 잘 일어나지 않아 성형 가공성이 좋다.
- ③ PDMS 는 homogeneous, isotropic 하고, 광학적으로는 300nm 의 두께까지는 투명하다. 따라서 이러한 성질을 이용하여 optical device 를 만드는 데 이용될 수 있다.

④ PDMS 는 매우 내구성이 강한 elastomer 다. 이 것은 실험에서 molding 한 PDMS stamp 로 수백번, 몇 달 동안이나 사용해도 눈에 띄는 degradation 이 일어나지 않은 것으로 파악할 수 있다.

⑤ PDMS 의 surface property 는 SAMs(self-assembly monolayers)의 형성에 의해 생기는 plasma 의 조절에 의해서 쉽게 modified 될 수 있고, 이는 물질간에 적절한 interfacial 상호작용에 의해서 interfacial energy 값이 넓은 영역에 걸쳐 나타날 수 있다.

## PR (Photoresist)의 특성

반도체 소자의 미세화를 주도해 온 핵심은 Photoresist 를 이용한 식각기술이다. Photoresist 는 고분자와 감광제가 섞인 혼합물로 빛에 의해 그 화학적인 성질이 변화하여 어떤 파장의 빛에 노출을 시키면 특정 용매에 대한 용해도가 크게 바뀌게 된다. 따라서 그 용매에 대한 노광부와 비 노광부의 용해 속도에 차이가 나서 일정 시간이 지나면 미처 다 녹지 않은 부분이 남아 패턴이 형성되는 것이다. 이런 Photoresist 의 성질을 이용하여 반도체가 그려진 설계도를 새겨 넣은 Mask 를 광원과 실리콘 웨이퍼 위에 코팅된 포토레지스트 막 사이에 놓고 광원을 켜면, 마스크에 새겨진 회로가 그대로 Photoresist 에 옮겨지게 되고, 이것을 광 식각 공정이라고 한다.

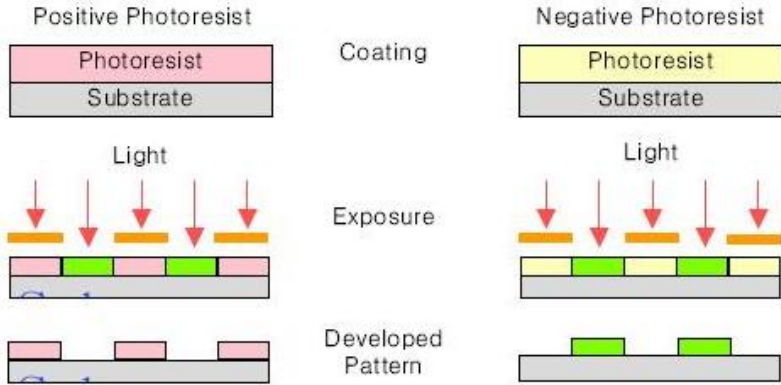


그림 1 포토레지스트 노광/현상 공정도.

위 그림 1 은 Photoresist 노광/현상 공정도이다. 그림 1 에서 보면 포토레지스트의 종류가 Positive 방식과 Negative 방식이 있는데 Positive 포토레지스트의 특징은 노광에 의해 분해, 분자쇄절단(Chain Scission)등이 일어나 용해성이 증가되는 종류이다. 즉, 빛이 직접 조사된 부분은 다중체가 끊어지게 된다. 또한 Negative 와는 달리 팽윤현상이 적으며 내 Etching 성도 뛰어나고 특히 해상력이 탁월하여 고집적도 반도체 제조공정에 주로 쓰이고 있다.

Negative 포토레지스트는 노광에 의해 가교, 광이량화 등의 반응으로 분자량이 크게 증가하면서 용해성이 떨어지고 열적 특성, 내화학성이 현저하게 좋아진다. 즉, 빛이 직접 조사된 부분은 분자 사이에 체인을 형성하여 다중체를 형성하게 되므로 단단하게 경화된다. 강한 부식액을 써야 하는 공정이나 집적도가 낮은 반도체 제조시에 이용되고 있으나, 현상(Development)시 Pattern 의 팽윤(Swelling)현상으로 해상력이 2~3  $\mu\text{m}$  정도에 불과하여 고집적도 반도체 공정에서는 이용되지 못하고 있다.

## 실 험

### 제 1 절. 실험 요약

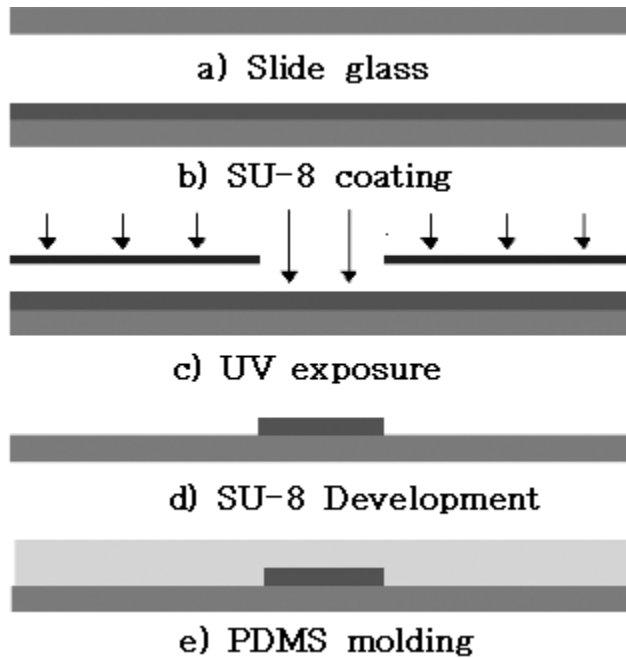


Figure 1. process of the soft lithography method.

- ① 먼저 photo mask 를 제작한다. 워드나 포토샵으로 두께 50 $\mu$ m 의 선을 디자인 한다. 이를 레이저 프린트로 OHP-film 에 인쇄해 일정한 패턴의 마스크를 만든다.
- ② Slide glass 에 두께 50 $\mu$ m 정도의 polystyrene vinyl 을 덮어 틀을 만든 뒤 Negative PR 인 SU-8 을 얇게 편다.
- ③ 코팅된 slide glass 를 90 $^{\circ}$ C에서 15분간 pre-bake 시켜준다.
- ④ Prebake 된 slide glass 위에 photo mask 를 덮어준 후 365nm 의 UV 광선으로 120~180 초가량 노광한다.

- ⑤ 노광이 완료되면 90℃에서 5분간 post-bake 시켜준다.
- ⑥ post-bake 가 끝나면 현상액(SU-8 Developer)에 5~10분간 현상한다.
- ⑦ PR 로 채널 패턴이 되어있는 Slide glass 에 액상의 PDMS 용액을 붓는다.
- ⑧ Drying oven 으로 진공을 걸어 PDMS 의 기포를 모두 제거한 후 2 시간가량 oven 에서 가열하면 PDMS 가 고형이 된다.
- ⑨ 고형이 된 PDMS 를 PR 코팅된 Slide glass 에서 떼어낸다.
- ⑩ 떼어낸 PDMS 표면을 Tesla coil 을 이용하여 표면을 개질시킨다.
- ⑪ PDMS 를 깨끗한 Slide glass 에 붙인 후 hot plate 에서 약 2 시간 가열하면 두께와 폭이 50 $\mu$ m 인 Micro Channel 이 완성된다.

## 제 2 절. 실험 상세

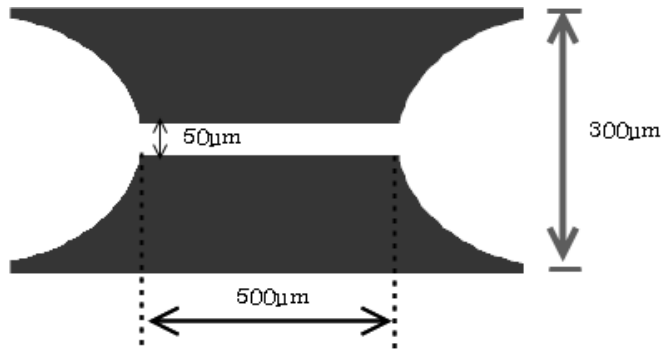


그림 2. Mask design.

- 마이크로채널을 제작하기에 앞서 우선시 되는 사항은 먼저 Mask 를 제작 하는 것이다. 이를 제작하기 위해 기존의 600dpi 레이저 프린터의 경우 입자 하나의 크기가 약 40 $\mu$ m 정도여서 Mask 제작에 용의치 않다. 따라서 최소 1200dpi 이상의 고해상도 레이저 프린터가 필요하며 실험에 쓰인 것은 약 2000dpi 의 고해상도 프린터를 사용하였다. Mask 의 디자인은 위와 같다.

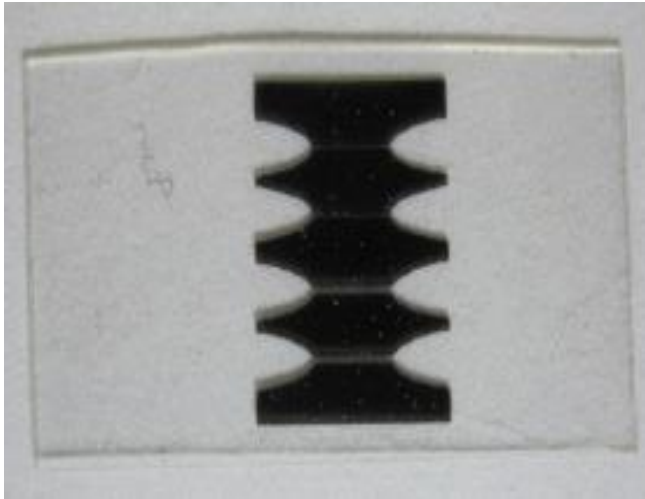


그림 3. 완성된 마스크.

- 디자인된 것을 OHP-film 과 같은 투명한 film 에 인쇄한다. Mask 제작이 완료되면 Slide glass 에 두께 50  $\mu\text{m}$  의 polystyrene vinyl 을 붙여 틀을 만든다. 이 틀은 Mask 보다 크게 제작되어야 하며 충분히 넉넉하게 만들어준다.

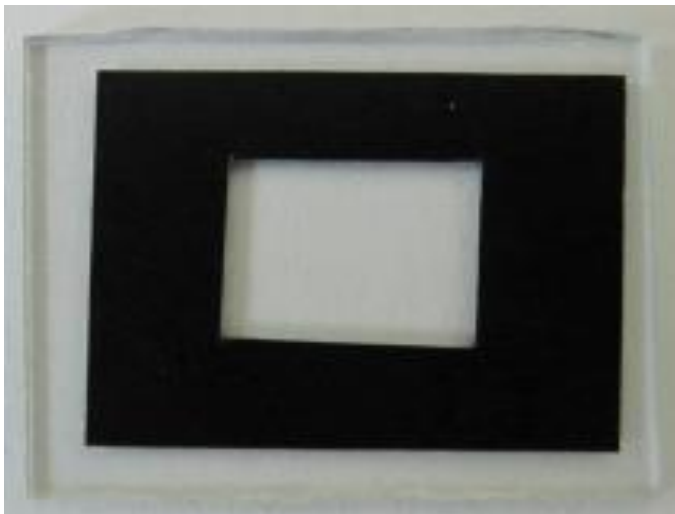


그림 4. polystyrene vinyl coating.



- 틀에 PR 을 부어 부드러운 플라스틱으로 틀을 긁어 PR 이 골고루 얇게 퍼지도록 편다.

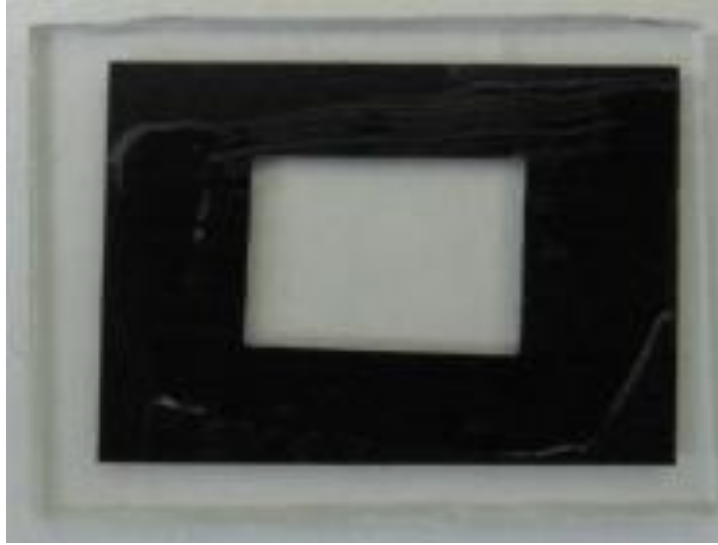


그림 5. PR 도포 후 모습.



그림 6. Hot plate.

- 코팅이 완료된 Slide glass 를 90℃의 hot plate 위에서 15 분간 pre-bake 시켜준다.



그림 7. UV light control box.

- Mask 를 덮고 365nm 의 UV 광선에서 150 초간 노광시켜준다. 이때 노광 시간이 늘어날수록 현상 시간을 더 늘려주어야 하며 180 초 이상의 노광에선 PR 표면이 변색되므로 주의한다.

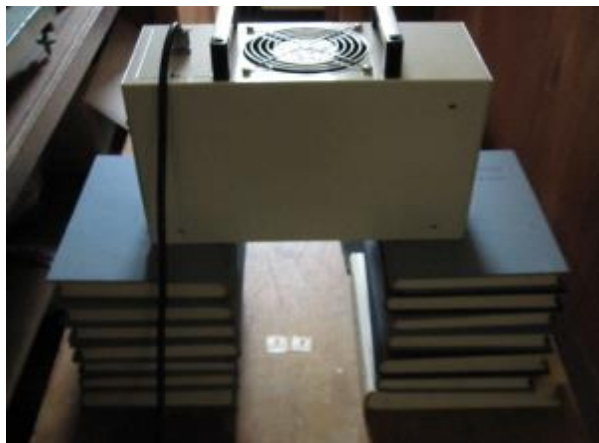


그림 8. UV light exposure.

- 노광이 완료되면 Mask 와 polystyrene vinyl 을 벗겨 낸 후 90℃에서 5 분간 post-bake 시켜준다.

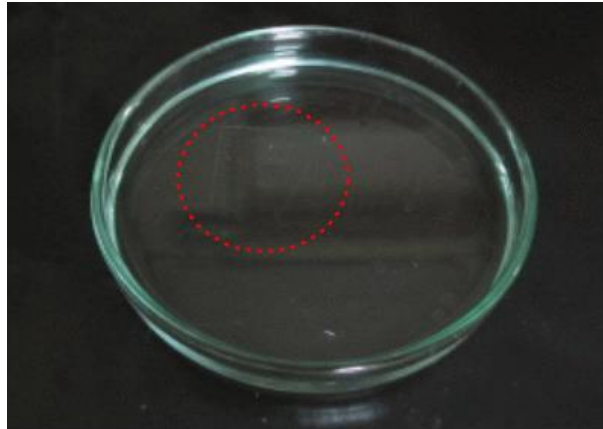


그림 9. SU-8 development.

- 다음으로 현상액(SU-8 development)에서 5~10 분간 현상시켜주면 원하는 패턴의 PR 을 얻을 수 있다.



그림 10. 현상 후 PR 모습.

- 현상이 완료된 Slide glass 를 깨끗한 물로 세척 및 건조 시키면 원하는 패턴의 PR 을 Slide glass 에 얻을 수 있다. 원하는 패턴이 완료되면 PDMS 를 이용하여 분을 뜨게된다.



그림 11. PDMS (A)&(B).

- PDMS (A)와 (B)를 각각 5ml, 0.5ml 로 혼합한 후 잘 저어준다. 준비된 틀에 채널 패턴이 인쇄된 Slide glass 를 넣고, 혼합된 PDMS 를 붓는다.



그림 12. Pour PDMS into the mold.

- 액체상태의 PDMS 를 drying oven 에 넣고 압력조절나사를 단힘 상태에 놔두고 공기펌프로 공기를 빨아들여 압력을 약 1torr 에 맞춘다. 압력조절나사를 N 에 두고 공기펌프를 끄고, 1 시간 동안 기다리게 되면 PDMS 에 남아있는 기포가 모두 제거된다.



그림 13. Drying oven.



그림 14. 압력조절나사와 기압계.

- 남아있는 기포가 모두 제거되면 역시 drying oven 을 이용하여 70℃에서 2 시간가량 가열하면 PDMS 가 고형이 된다. 이때 주의할 점은 PDMS 를 drying oven 에서 꺼낼 때 반드시 압력조절나사를 열림에 두고 기압을 맞춘 뒤 꺼내야 한다는 것이다.

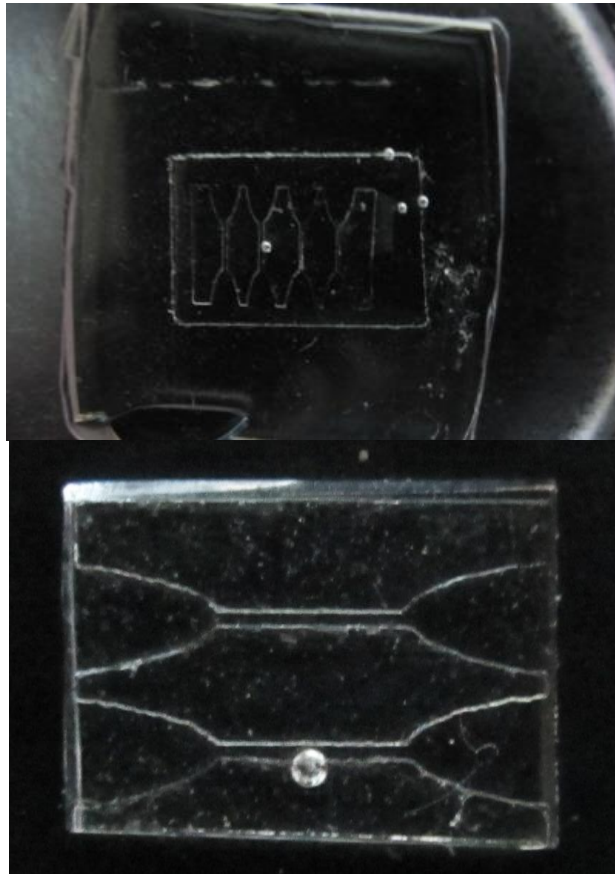


그림 15, 15-1 고형화 시킨 모습.

- 고형이 된 PDMS 를 Slide glass 와 분리시킨 뒤, 적당한 크기로 자른다.

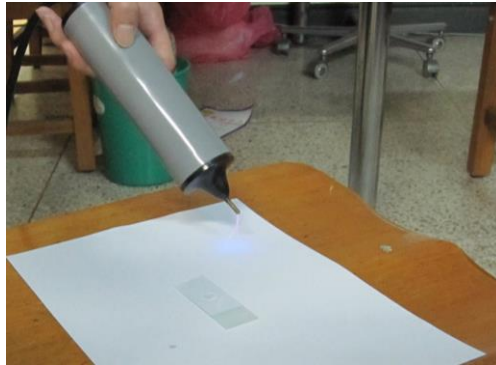


그림 16. Tesla coil

- 채널 본이 떠진 PDMS 의 표면을 Tesla coil 을 이용하여 개질시킨 뒤 적당한 크기로 자른 slide glass 에 붙여 고정시킨다.
- Hot plate 에서 90℃에서 두 시간 가량 가열하면 micro channel 이 완성된다.

## 결론



그림 17. Micro channel

앞의 실험 방법에 따라 다음과 같은 Microchannel 을 제작 할 수 있었다. Microchannel 은 광학적으로 투명하며 Channel 내의 입자 이동을 관측하는데

용이하다. 제작 할 때에는 PDMS 의 응고상태 또는 현상과정에서의 시간적 오차, PR 도포 시 불균일적인 두께에 의해 제작 할 때 마다 Channel line 의 두께는 오차가 생길 수 있으므로 여러 번 실험을 하여 원하는 두께의 Microchannel 을 제작하도록 한다.

### Acknowledgements

이 연구는 2012년 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

### 참고문헌

1. Byung-Ho J; Linda MVL; Kathleen MM; David JB (2000)/ Three-dimensional microchannel fabrication in PDMS elastomer. J MEMS 9(1): 76--102
2. Brandrup J; Immergnt EH (1989) Polymer Handbook, 3rd edn. Vol. 6, John Wiley & Sons
3. Johnson DW; Jeffries A; Minsek DW; Hurditch RJ (2002) Improving the process capability of SU8, part 2. MicroChem / Corp.  
(<http://www.microchem.com>)
4. Berdichevsky, Y., Khandurina, J., Guttman, A., and Lo, Y. H., "UV/ozone Modification of Poly(dimethylsiloxane) MicrofluidicChannels", *Sensor. Actuat. B*, **97**, 402-408 (2004).
5. Yuk Su Ah. "Microchannel fabrication" Chungnam univ. energy; environment; new material Lab.
6. Lab-on-a-chip /네이버 백과사전 (<http://100.naver.com/100.nhn?docid=767552>)



## 임피던스 분석을 통한 AC구동형 OLED<sup>1</sup>

유세기<sup>2</sup>

임피던스 분석방법을 이용하여 다층으로 구성된 AC구동형 유기발광소자(organic light emitting diode, OLED)의 특성을 분석하였다. 저항 성분 뿐만 아니라 capacitance 성분이 유기 발광소자의 작동에 중요한 영향을 끼치고 있음을 발견하였으며, 이 분석을 통하여 저항과 capacitance의 특성을 잘 제어해야만 고 품질의 유기발광소자를 구현할 수 있음을 확인하였다. 또한 저 전력 구동과 더불어 고휘도가 가능한 AC 구동형 유기 발광소자가 차세대 평판 디스플레이 또는 조명의 주요한 후보가 될 수 있는 가능성을 확인하였다.

### 서론

유기발광소자는 핸드폰 위주의 소형 디스플레이의 형태로 우리의 일상 생활 주위에서 쉽게 접할 수 있으나, 아직까지도 대면적 디스플레이는 상업적으로 시판하기에 여러 부분에서 미진한 면이 있어 아직도 가전제품 매장에서 구매하기에는 이른다. 이는 아직도 OLED의 경우 좀더 기초적인 연구가 필요하다는 것을 반증하고 있다. 기존의 OLED의 경우 DC 전류가 흐르는 소자에 대해 집중적으로 연구가 행해져 왔다. 많은 경우 소자의 전하가 한 방향으로만 흐르게 되는 경우, 어떤 이유로 인해서든지 간에 내분에 전하가 쌓일 수 있는 요소가 생성된다면 이 부분은 계속적이 축적이 진행될 것이다. 이러한 한 방향의 전하 흐름으로 인한 문제의 소지를 없앨 수 있는 것이 바로 AC 구동 방식의 OLED이다. 최근 들어 OLED는 저가격, 대면적화 등의 장점으로 많은 연구가 진행되고 있지만, 낮은 효율과 전하수송 메커니즘에 대한 연구가 미비하여 보다 더 많은 연구가 필요하다. 이에 탄소나노구조물의 percolation 을 이요하거나, 임피던스 분석법을 이용하여 전하수송 파라미터 추출 및 등가회로

---

<sup>1</sup> 이 논문은 2012학년도 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

<sup>2</sup> 한국외국어대학교 자연과학대학 전자물리학과 교수

모델링, 계면 특성 개선을 이용한 전하수송 향상을 통한 소자 특성 개선, 나노구조물 최적화를 통한 고품위 AC구동 OLED 구조를 제시하고자 한다.

## 실 험

다층 구조의 AC OLED device는 그림 1(a)에서 CNT의 조성비율 (wt%)을 조절하여 낮은 구동 전류의 AC OLED device를 제작 하고자 한다. 처음에는 사용되는 물질의 전기적 현상을 impedance analysis 을 확인하고, 다층구조의 AC OLED device을 제작하였을 때 소자 내부에서 일어나는 전기적 현상을 impedance analyzer (Ivium compactstat) 을 통하여 측정 한다. Impedance analyzer는 일정한 전압에서 2MHz ~ 10Hz의 frequency을 변화하여 측정한다(그림 1(b) 참조).

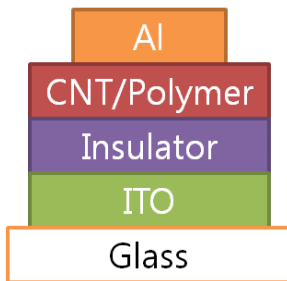


그림 1(a). AC OLED device 구조.

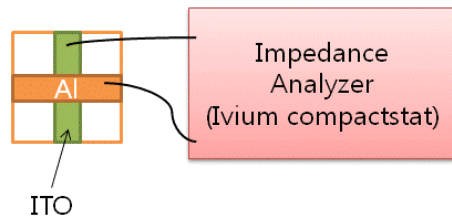


그림 1(b). Impedance 측정 방법.

또한, 측정된 값을 cole-cole plot을 통하여 resistance 및 capacitance을 계산 하고 AC OLED device의 등가회로를 구성한다. 이때 우리가 사용하는 등가회로는 Randles Cell을 통하여 도식화 할 것이며, cole-cole plot을 Randles cell 모델을 통하여 수학적으로 계산할 수 있다.(그림 2 참조).[1]

먼저 다층 구조에서 ITO 및 Al electrode 내부에 CNT을 첨가하지 않았을 때의 Impedance을 분석하고, CNT의 조성비율(wt%)가 증가함에 따라 AC OLED device의

Impedance 측정을 통하여 resistance 및 capacitance을 관찰한다. CNT를 첨가함으로써, CNT의 특성으로 인하여 local field가 생기고 CNT의 percolation이 발생하게 되는데 CNT를 잘 조절하여 percolation을 제어하여 leakage current가 생기지 않게 CNT의 특성을 조절하여 실험을 해야 한다.

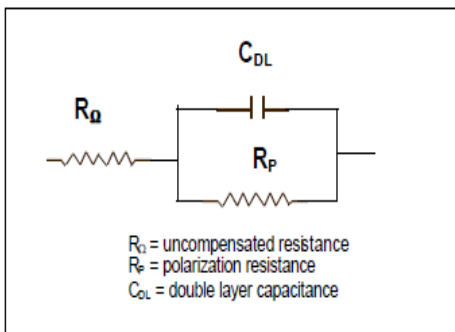


그림 2(a). Randles Cell Model.

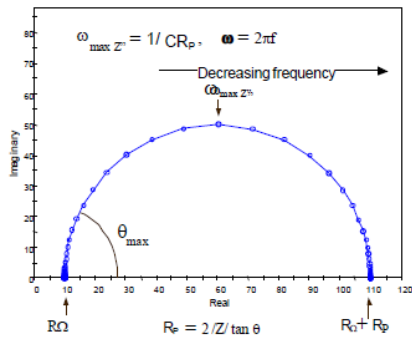
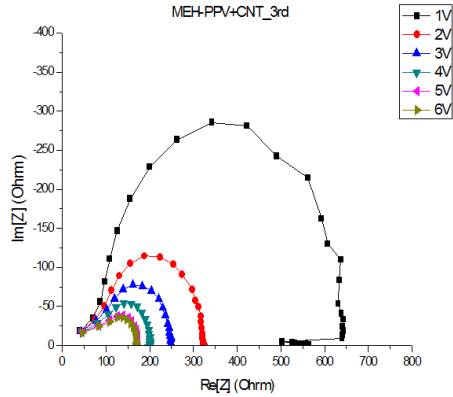


그림 2(b). Randles Cell cole-cole plot.

그림 3과 같은 Cole-Cole plot을 impedance analyzer 기계를 사용하여 얻었다. 가해주는 AC 전기의 전압을 올릴 때 마다 반지름은 줄어들게 되며, 이는 그림 2(a)와 같은 모델의 경우 나타나는 전형적인 현상이다. 또한 유기 발광소자가 다이오드임을 감안하면 입력 전압이 높아짐에 따라 저항 부분이 커지는 것을 쉽게 알 수 있다. 여기서 나타나는 capacitor는 입력 전압 값에 크게 의존하지 않으며 약 2 nF를 나타낸다. 기생 저항은 약 500에서 90 Ohm으로 줄어드는 경향을 나타내고 있다.  $R_{\Omega}$  저항은 40~50 Ohm 정도를 나타낸다. CNT를 추가한 AC OLED 샘플의 경우 일반적으로 휘도가 증가하고 전류가 줄어드는 경향을 나타내고 있다. 이는 CNT가 수많은 micro-capacitor를 형성하게 되어서 이 capacitor로 인하여 총 저항인 임피던스가 증가하여, 구동 전류가 줄어드는 것이다. 휘도는 CNT의 끝단에 형성된 많은 local 전기장이 증대되어서 발광 메커니즘이 효율적으로 작동할 여건이 형성되었기 때문으로 볼 수 있다.



## 결론

임피던스 분석장비와 모델링을 통해 AC 유기발광 소자의 저항과 Capacitance 값을 얻을 수 있고, CNT 유무에 따른 소자의 특성과 연결시킬 수 있다. 즉 CNT가 micro-capacitor를 형성하고 강한 국소 전기장을 형성하여, 고휘도 저전력의 특성을 갖는 고품위 유기 발광소자의 가능성을 높여주었다.

## Acknowledgements

이 연구는 2012년 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

- [1] S. Iijima, Nature (London) **354**, 56 (1991).

- [2] C. W. Tang and A.C. Albrecht, J. Chem. Phys. **62**, 2137 (1975).
- [3] C. W. Tang, Appl. Phys. Lett. **48**, 183 (1986).
- [4] B. O. Seraphin, Topics in applied physics; solar energy conversion: solid-state physics aspects (vol. 31), (1979).
- [5] R. Radbeh et. al., Polym. Int. **59**, 1514 (2010).
- [6] S. Kazaoui et. al., Appl. Phys. Lett. **98**, 084314 (2005).
- [7] J. Sung et. al., Nano Lett. **11**, 966 (2011)
- [8] Whikun Yi et al., J. Appl. Phys. **89**, 4091 (2001).
- [9] Won Seok Kim et al., Appl. Phys. Lett. **81**, 1098 (2002).
- [10] SeGi Yu et al., Appl. Phys. Lett. **80**, 4036 (2002).
- [11] Whikun Yi et al., Adv. Mat. **14**, 1464 (2002).
- [12] Jin-Young Kim et al., IEEE Trans. El. Dev. **57**, 1470 (2010).
- [13] W. U. Huynh, J. J. Dittmer, A. P. Alivisatos, Science, **295**, 2425 (2002)
- [14] Eugene Oh et al., Mater. Lett. **62**, 3456 (2008).

## Comparative study of corrosion inhibition of aluminum in acidic and neutral chloride media by some amino acids<sup>1</sup>

윤종화, 김연규<sup>2</sup>

Cl<sup>-</sup>가 포함된 용액에서 일어나는 Al의 부식에 대하여 methionine과 histidine의 부식 억제 효과를 조사하였다. Methionine은 낮은 덮힘율로 Al 표면에 Langmuir adsorption isotherm 에 따른 흡착이 일어나며, histidine은 상대적으로 높은 덮힘율로 10<sup>-4</sup> M 이하 농도에서 Al 표면에 Langmuir isotherm, 10<sup>-4</sup>M 이상 농도에서 Temkin adsorption isotherm 에 따른 흡착이 일어나는 것으로 보인다.

### 서론

알루미늄은 가볍고 열과 전기 전도도가 좋은 금속이기 때문에 자동차, 항공기, 가정용품, 전자제품 등에서 많이 사용된다. 또한 대기나 용액 중에서 산화를 통해 Al 자체를 보호하는 얇은 산화물 피막을 형성하는 것으로 알려져 있다. 이 산화물의 뛰어난 부식 억제력에도 불구하고 염화이온 매질에서는 국부적 부식으로 인해 부동화 막이 깨지는 공식(pitting corrosion)이 발생해, Cl<sup>-</sup>이 포함된 용액에서 Al의 부식 억제에 대한 연구가 진행되어 왔다.<sup>1-7)</sup>

N이나 S를 포함하는 유기화합물들은 금속의 부식을 억제하는데 효과가 높은 것으로 보고된 바 있다.<sup>1,2)</sup> 그러나 부식억제 효과를 보이는 유기화합물의 유해성이 문제되어, 최근에는 환경 친화적 억제제인 아미노산을 이용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 아미노산은 중성 용액에서 zwitter ion의 형태로 존재하며, Cl<sup>-</sup>가 많은 용액에서는 흡착된 Cl<sup>-</sup>가 zwitter ion의 암모늄 이온을 끌어당기기 때문이 아미노산의 흡착을 증진시키는 효과가 있다는 보고도 있다.<sup>3)</sup>

이 논문에서는 Cl<sup>-</sup>가 존재하는 용액에서 아미노산 형태에 영향을 주는 pH에 따라 낮은 pH 인 HCl과 중간 pH인 NaCl에서 histidine과 methionine이 Al의 부식에 미치는 영향을 조사하였다.

### 실험

모든 전기화학적 측정은 개인용 컴퓨터(PC)로 조정하는 Gamry사의 Model G 750/ZRA Potentiostat/Galvanostat와 동일 사의 기준 전극과 보조 전극을 각각 소결유리로 칸막이 하여 세 부분으로 분리된 용기가 되도록 구성된 EuroCell System을 이용하여 수행하였다. 동일 회사가 제공한 DC105(Corrosion Techniques)와 Echem analysis(V 5.3) software를 사용하여 데이터를 측정하고 분석하였다.

작업 전극은 Sigma-Aldrich 사의 순도 99.999%, 직경 3.0mm인 Al-rod를 절연성 epoxy 수지로 Al-disk 전극을 만들어 사용하였다. 기준 전극은 포화 Ag/AgCl, 보조 전극은 Pt-wire로 구성되었다. 따라서 본 논문에 표시한 전위는 포화 Ag/AgCl 기준 전극에 대한 값이다.

<sup>1</sup> 이 논문은 2012학년도 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

<sup>2</sup> 한국외국어대학교 자연과학대학 화학과 교수

Deaerated solution 에서의 측정은 Ar을 10분 동안 purging 한 후 Ar 분위기에서 수행하였다. 부식 억제제로 사용한 아미노산은 Sigma-aldrich 사의 99% 순도 L-methionine(Met)과 L-histidine(His)을 더 정제하지 않고 사용하였다. Al-disk 전극은 측정 전에 No. 1200의 emery paper로 연마한 후 증류수로 씻은 다음에 실험 하였다.

## 결 과

### 1. Potentiodynamic polarization (Pd)

HCl용액에 Met과 His을 첨가한 용액에서 측정된 Pd 곡선들은 Fig. 1 과 Fig. 2에 나타내었다.

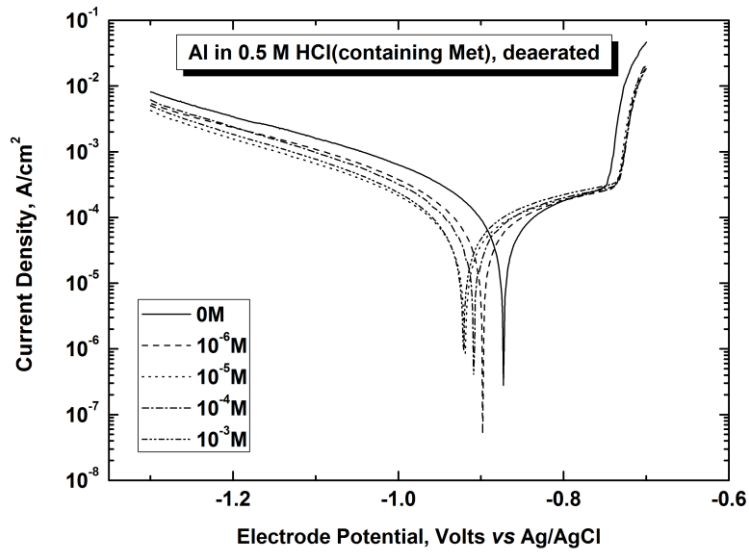


Figure 1. Potentiodynamic polarization curves for the aluminum electrode in deaerated 0.5M HCl solution containing various concentration of methionine at a scan rate of 1 mV/sec.

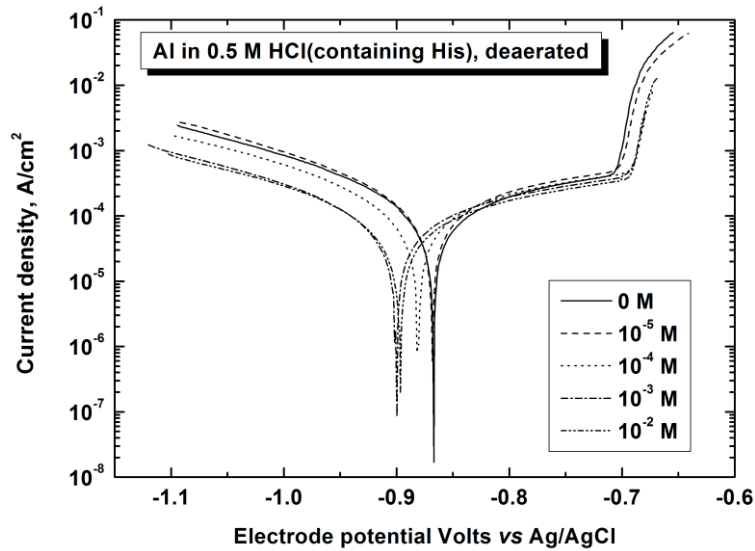


Figure 2. Potentiodynamic polarization curves for the aluminum electrode in deaerated 0.5M HCl solution containing various concentration of histidine at a scan rate of 1 mV/sec.

Fig. 1 과 Fig. 2에서 Met 또는 His의 농도가 증가하면 환원전류가 감소하여 corrosion potential이 음의 방향으로 이동하는 cathodic inhibition의 효과를 보이고 있다.

NaCl용액에 Met과 His을 첨가한 용액에서 측정된 Pd 곡선들은 Fig. 3 과 Fig. 4에 나타내었다.

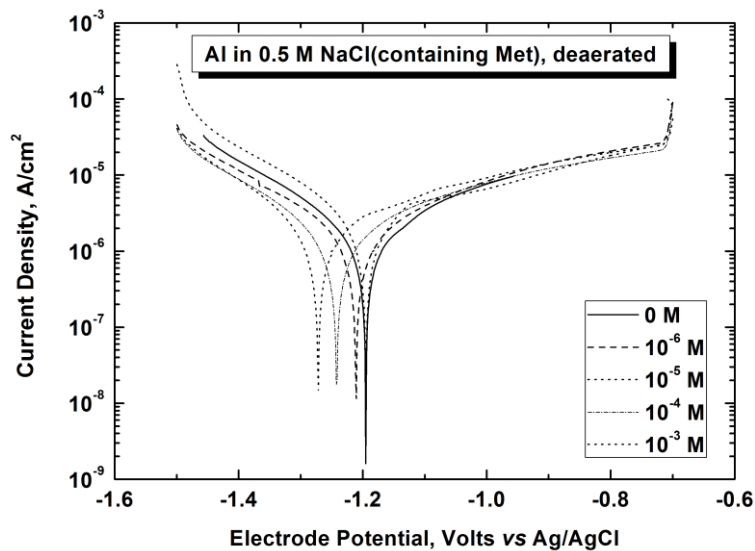


Figure 3. Potentiodynamic polarization curves for the aluminum electrode in deaerated 0.5M NaCl solution containing various concentration of methionine at a scan rate of 1 mV/sec



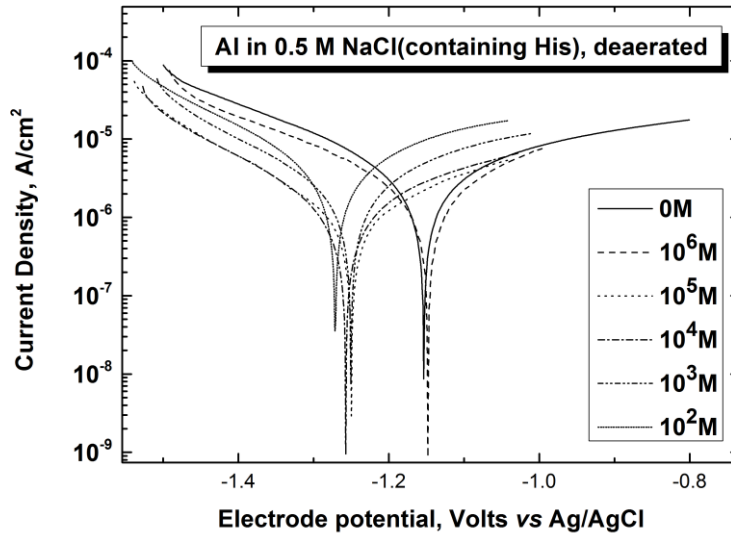


Figure 4. Potentiodynamic polarization curves for the aluminum electrode in deaerated 0.5M NaCl solution containing various concentration of histidine at a scan rate of 1 mV/sec

Met의 경우 HCl용액에서와 마찬가지로 corrosion potential 은 음의 방향으로 이동하고 corrosion current가 감소하는 것으로 보아 cathodic inhibition 이다. NaCl 용액에 His를 첨가할 경우 His의 농도가 10<sup>4</sup>M 이하일 경우 환원 전류의 감소로 부식억제 효과를 보이고 있으나 10<sup>4</sup>M 이상일 경우 산화전류의 증가로 부식전류가 다시 증가하였다. 이는 Al 전극에 흡착된 His의 coverage가 증가하면 분자간에 repulsive force가 작용하여 탈착(desorption)이 일어나는 현상 때문으로 보인다.

## 2. Inhibition Efficiency (IE) and Adsorption Isotherm

Fig. 1~4 로부터 얻은 산화와 환원 Tafel line 과 equilibrium potential 의 교점으로부터 부식 전위와 부식 전류를 구했으며, 부식 전류로부터 계산한 부식 억제 효율(%)을 Table 1. 과 Table 2.에 나타내었다. 억제 효율은 식 (1)을 이용하여 계산하였다. 식(1)에서 I<sub>Corr</sub>은 부식 억제제를 포함하지 않는 용액에서의 부식 전류이고 I<sub>Corr(Inh)</sub>는 부식 억제제인 아미노산이 첨가된 용액에서의 부식 전류이다.

$$IE = \{I_{Corr} - I_{Corr(Inh)}\} \times 100 / I_{Corr} \quad (1)$$

Coverage( $\theta$ )는 (2) 식에 의해서 계산 하였다. 이를 이용하여 인접한 흡착분자의 영향을 고려 하지 않은 Langmuir Isotherm을 적용하였다. 여기서 K는 흡착 평형상수, C는 아미노산의 농도이다. (3)식을 변형한 (4)식을 이용하여 C의 변화에 대한 (C/ $\theta$ )를 도출하여 절편으로부터 K를 구할 수 있으며, 이때 (4)식의 기울기가 1.0 보다 클 경우에는 modified Langmuir isotherm (5) 식을 적용하여 기울기와 절편으로부터 K를 구한다. 또한 평형상수 K와 흡착 자유 에너지  $\Delta G_{ads}$ 의 관계식은 (6)식

과 같으며 여기에서 용매가 물이므로,  $C_{\text{solv}}$ 는  $55.5\text{mol/dm}^3$ 이고,  $R$ 은 기체상수,  $T$ 는 절대온도이다.

$$\theta = \{I_{\text{corr}} - I_{\text{corr(Inh)}}\}/I_{\text{corr}} \quad (2)$$

$$K = \theta/\{C(1 - \theta)\} \quad (3)$$

$$(C/\theta) = (1/K) + C \quad (4)$$

$$(C/\theta) = (n/K) + nC \quad (5)$$

$$K = \{1/C_{\text{solv}}\}\exp\{-\Delta G_{\text{ads}}^{\circ}/RT\} \quad (6)$$

$\Delta G_{\text{ads}}$  값이  $-20\text{ kJ/mol}$  보다 클 경우에 전극표면과 흡착분자 사이의 정전기적 인력에 의해 physisorption이 일어나고,  $-40\text{kJ/mole}$  보다 작을 경우에는 배위결합에 의한 chemisorption이 일어난다고 알려져 있다.<sup>6, 8, 9, 10)</sup>

흡착 분자들 사이에 서로 attractive force 또는 repulsive force 가 작용할 수 있으며 이 경우 Temkin의 logarithmic isotherm 식(7) 이 적용된다.

$$\theta = (RT/r) \ln(KaC) = (1/f)\ln(KC) \quad (7)$$

(7)식에서  $f=r/RT$  는 흡착 분자간의 상호작용을 나타내는 인자로,  $f>0$ 이면 흡착 분자간에 attractive force 가,  $f<0$ 일 때는 repulsive force 가 작용함을 의미한다.

Table 1. Corrosion parameters for different concentration of methionine and histidine in 0.5M HCl solution

Methionine				Histidine		
[Inh], M	$I_{Corr}, \mu A/cm^2$	$E_{Corr}, V$	IE, %	$I_{Corr}, \mu A/cm^2$	$E_{Corr}, V$	IE, %
0	270.6	-0.867	0	270.6	-0.867	0
$10^{-6}$	194.1	-0.897	28.25			
$10^{-5}$	165.7	-0.918	38.75	84.4	-0.868	68.741
$10^{-4}$	163.6	-0.908	39.53	58.4	-0.881	78.37
$10^{-3}$	122.5	-0.920	54.74	47.1	-0.896	82.556
$10^{-2}$				48.5	-0.899	82.037

Table 2. Corrosion parameters for different concentration of methionine and histidine in 0.5M NaCl solution

Methionine				Histidine		
[Inh], M	$I_{Corr}, \mu A/cm^2$	$E_{Corr}, V$	IE, %	$I_{Corr}, \mu A/cm^2$	$E_{Corr}, V$	IE, %
0	10.5	-1.195	0	10.5	-1.195	0
$10^{-6}$	6.1	-1.210	42.00	1.91	-1.148	81.81
$10^{-5}$	4.1	-1.194	60.14	1.49	-1.250	83.33
$10^{-4}$	2.9	-1.242	72.04	1.58	-1.257	85.81
$10^{-3}$	3.7	-1.271	64.38	3.27	-1.251	87.52
$10^{-2}$				5.69	-1.272	84.95

**Methionine의 경우:** Met의 경우 pH에 따른 분율 조성(Fig 5.)을 살펴보면 HCl에서의 주화학종은 Fig. 6-1, NaCl에서의 주 화학종은 Fig. 6-2로 존재한다. 주종의 형태가 서로 다르기 때문에 흡착 형태에 대해 비교를 해볼 수 있다.

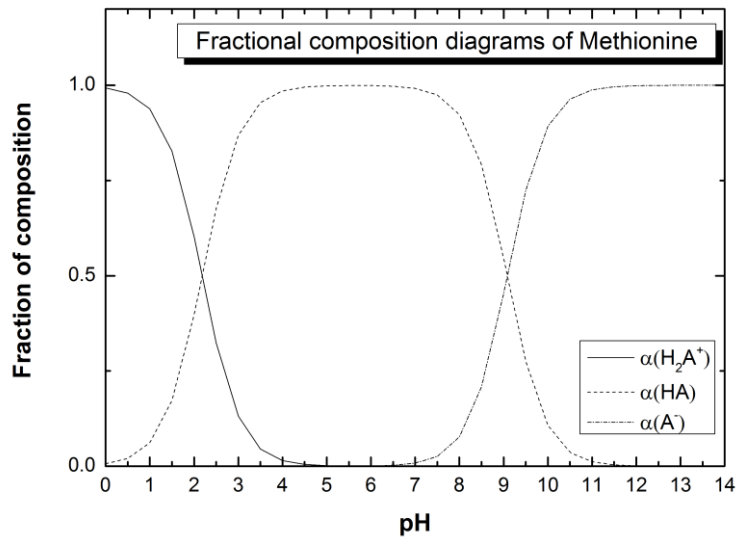


Figure 5. Fractional composition diagrams of methionine against the pH of solution.

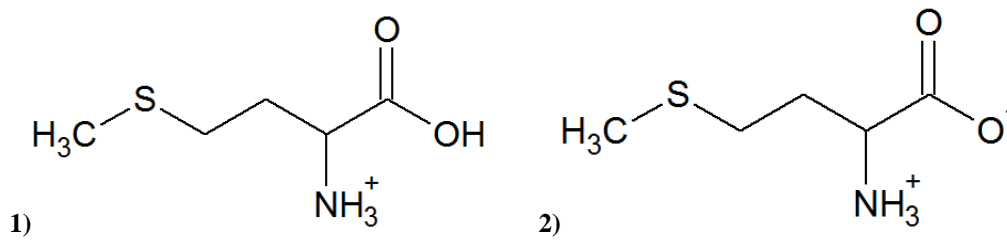
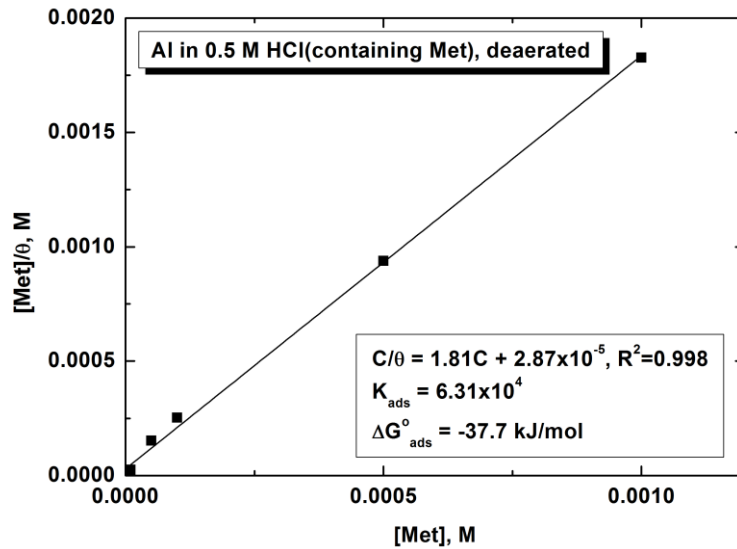


Figure 6. Major species of methionine in HCl(1), NaCl(2)

HCl 용액에서 Met의 농도가  $10^{-3}\text{M}$ 일 때의 흡착 효율이 약 55%이었으며, Temkin isotherm을 적용하였을 때는 선형관계를 보이지 못하는 것으로 보아 Temkin보다는 Langmuir isotherm을 적용하는 것이 적합하다고 보인다. Langmuir isotherm을 적용하여 C에 대한  $C/\theta$ 를 도시하면 Fig. 7과 같다.  $R^2 = 0.998$ 로 상관관계는 좋은 편이나, 기울기가 1.81로 1.0에서 벗어나므로 modified Langmuir isotherm (5식)을 적용하면  $\Delta G_{\text{ads}}^{\circ} = -37.7\text{kJ/mol}$ 임을 알 수 있다.  $-40\text{kJ}$ 에 가까운 값을 갖는 것을 통해 흡착 과정에서 weak chemisorption이 일어나는 것으로 보인다. 이를 통해 Met의 흡착 과정을 Fig. 6-1의 형태에서 비 공유 전자쌍(lone pair)을 갖는 S가 Al 표면에 배위되는 결합을 통해 흡착하는 것으로 추측할 수 있다.



**Figure 7. Curve fitting of methionine adsorption on aluminum by Langmuir isotherm in deaerated 0.5M HCl solution**

NaCl 용액에서의 Met의 Langmuir isotherm을 Fig. 8에 나타내었다. HCl 용액에서와 유사한  $\Delta G^{\circ}_{ads} = -36.7 \text{ kJ/mol}$ 의 값을 갖는 것을 통해 NaCl 용액에서도 weak chemisorption 이 발생하는 것을 추정할 수 있으며, 마찬가지로 Fig. 6-2의 형태가 주종으로 존재하며, Met내 side chain의 (-S-)를 통해 흡착 하고 있는 것으로 추정 할 수 있다.

앞에서 언급한 바와 같이 Al 전극과 methionine 분자 사이의 흡착을 methionine 구조의 (-S-)에 존재하는 비공유 전자 쌍이 Al에 배위되는 chemisorption으로 가정하면, 산성 용액에서는 Fig. 6-1과 같은 구조로 존재하므로 흡착된 분자의 (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)들 사이에 repulsive force가 발생하는 반면에, 중성 용액에서는 Fig. 6-2와 같이 흡착된 분자는 zwitter ion이므로 (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)와 (-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 사이에 attractive force가 작용할 것이다. 따라서 Table 1과 2에서 보이듯이 산성 보다는 중성용액에서 coverage가 더 크고, Fig. 7과 8과 같이 Langmuir isotherm이 적용되는 농도의 범위도 더 넓을 것이다.

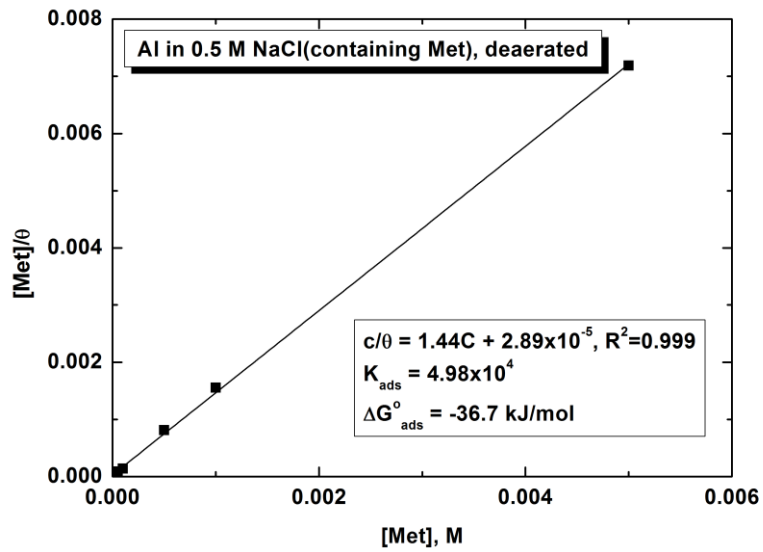


Figure 8. Curve fitting of methionine adsorption on aluminum by Langmuir isotherm in deaerated 0.5M NaCl Solution

Histidine의 경우 : Histidine의 pH에 따른 분율과 주 화학종을 Fig. 9와 10에 나타내었다.

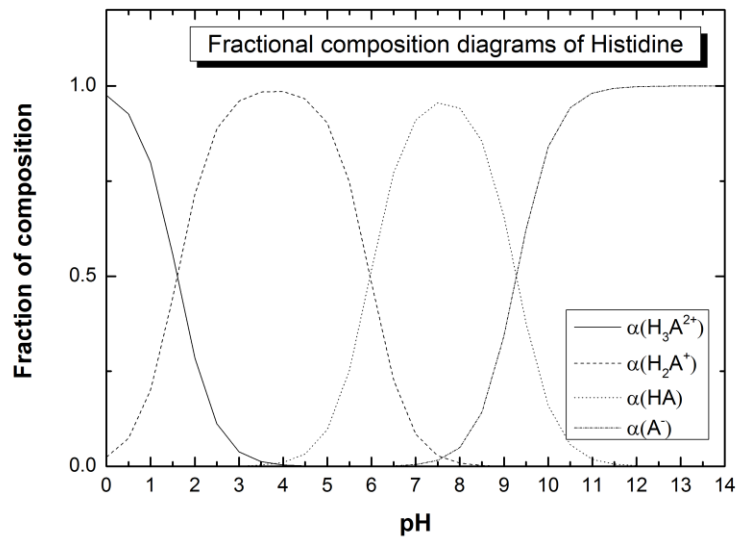


Figure 9. Fractional composition diagrams of methionine against the pH of solution.

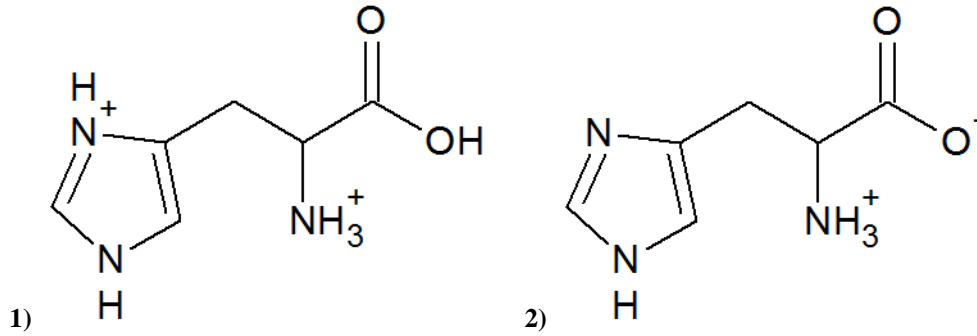


Figure 10. Major species of histidine in HCl(1), NaCl(2)

Fig. 9에 의하면 HCl 과 NaCl 용액에서 주로 존재하는 His의 구조는 각각 Fig. 10-1과 10-2와 같을 것으로 기대된다. 따라서 HCl 용액에서는 heterocycle에 있는 (=NH)의 lone pair와  $\pi$ -전자가 Al에, 그리고 NaCl 용액에서는 heterocycle에 있는 두 개의 lone pair 와  $\pi$ -전자가 Al에 배위될 수 있을 것이다. Table 1과 Table 2에서 NaCl 용액의 경우 흡착율이 더 높은 것은 이와 일치하는 현상이다. HCl 에서 His가 포함된 용액의 경우 Langmuir isotherm을 적용하여 도시하면 Fig. 11과 같다. 이 경우도 기울기가 1.0에서 벗어나므로 modified Langmuir isotherm을 적용하여  $\Delta G^{\circ}_{ads} = -37.7\text{kJ/mol}$  임을 알 수 있는데,  $\Delta G^{\circ}_{ads}$ 가  $-40\text{kJ/mol}$  에 가까운 값을 갖는 것으로 보아 이 경우 흡착과정은 chemisorption 이 일어나는 것으로, 이를 통해 앞서 말한 heterocycle 에 있는 (=NH)의 lone pair와  $\pi$ -전자의 배위에 의한 흡착임을 알 수 있다.

NaCl 용액의 경우 His의 농도가  $10^{-4}$  M 이하의 낮은 농도에서의 Fig. 12와 같이 Langmuir isotherm이 잘 적용되었으나,  $10^{-4}$  M 이상의 농도에서 coverage 가 0.85 이상이 되어 흡착된 분자간에 입체적인 repulsive force의 영향으로 Fig. 13과 같이 Temkin의 logarithmic isotherm 이 적용되었다. Langmuir isotherm (Fig. 12 참조)이 적용되는 낮은 농도에서  $\Delta G^{\circ}_{ads} = -48.7\text{kJ/mol}$  로 앞에서 언급한 바와 같이 His 분자내의 2개의 N에 있는 비 공유 전자쌍의 배위결합에 의한 chemisorptions 으로 추정된다. Temkin isotherm이 적용되는 Fig. 13과 같이  $\theta > 0.85$ 인 높은 농도에서는 앞에서 언급한 바와 같이 입체적인 영향으로 흡착이 어려워 지므로  $K = 0.557$ , 흡착 자유 에너지  $\Delta G^{\circ}_{ads} = -8.5\text{kJ/mol}$ ,  $f = -10$  이었다.

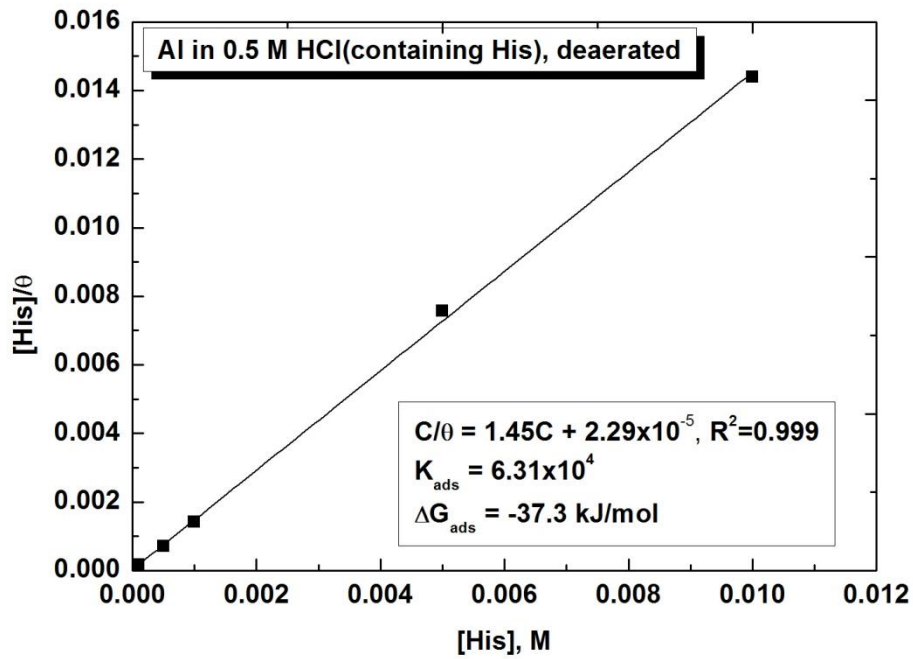


Figure 11. Curve fitting of histidine adsorption on aluminum by Langmuir isotherm in deaerated 0.5M HCl Solution

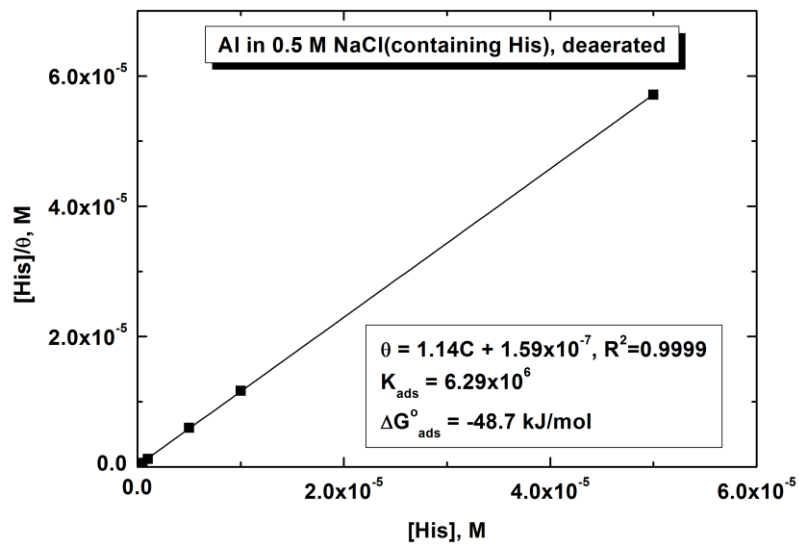
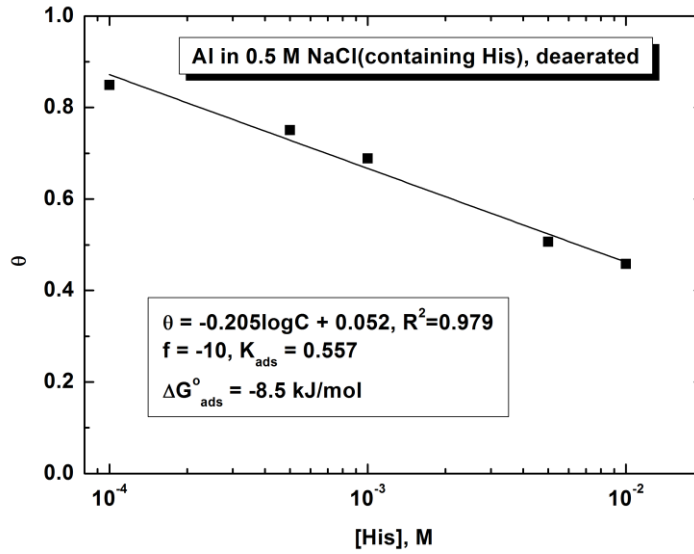


Figure 12. Curve fitting of histidine adsorption on aluminum by Langmuir isotherm in deaerated 0.5M NaCl Solution





**Figure 13. Curve fitting of histidine adsorption on aluminum by Temkin isotherm in deaerated 0.5M NaCl Solution**

### 결론

Cl<sup>-</sup>가 포함된 용액인 HCl, NaCl 용액에서 methionine과 histidine은 Al의 부식 억제 효과를 보이고 있으며,

1. Methionine은 HCl용액과 NaCl 용액 모두에서 분자내의 side chain 의 (-S-)에 있는 비결합 전자가 Al표면에 배위되는 화학흡착을 일으키며 흡착 분자들 사이의 상호작용이 거의 없는 Langmuir adsorption isotherm 에 따른 흡착이 일어나며,
2. Histidine은 HCl 용액에서 분자내의 side chain의 N에 있는 lone pair electron에 의해 화학 흡착을 일으키며, NaCl 용액에서는 10<sup>-4</sup> M 이하 농도에서 배위결합에 의한 화학흡착을 일으키며, Langmuir isotherm 따라 흡착이 일어나며, 10<sup>-4</sup>M 이상 농도에서 Al 표면에 흡착한 Cl<sup>-</sup>에 아미노산의 zwitter ion 의 암모늄의 정전기적 인력에 의한 물리 흡착을 일으키며, 흡착 분자들간의 상호작용이 존재 하는 Temkin adsorption isotherm 에 따라 흡착이 일어나는 것으로 보인다.

### Acknowledgements

이 연구는 2012년 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

### 참고문헌

1. E. M. Sherif and S. -M. Park, "Effects of 1.4-naphthaquinone on aluminum corrosion in 0.5M sodium chloride solution", *Electrochim. Acta*, 51, 1313 (2006).
2. D. Zhu and W. J. van Ooij, "Corrosion protection of AA 2024-T3 by bis-[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfide in neutral sodium chloride solution", *Corros. Sci.*, 45, 2177 (2003).

3. Khaled M. Ismail, "Evaluation of cysteine as environmentally friendly corrosion inhibitor for copper in neutral and acidic chloride solutions", *Electrochim. Acta*, 52, 7811–7819 (2007)
4. J. -K. Chon and Y. Kim, "Inhibition Effect of Amino Acids on the Corrosion of Aluminum in Artificial Sea Water", *J. Korean Chem. Soc.*, 12, 311 (2009).
5. J. -K. Chon and Y. Kim, "Chloride Ion Effects on Anodic Dissolution of Copper in Aqueous NaCl Solutions under Argon Atmosphere", *J. Korean Chem. Soc.*, 11, 159 (2008).
6. J. -K. Chon and Y. Kim, Inhibitor Effect of Amino Acids on the Corrosion of Copper in Artificial Sea Water, *J. Korean Chem. Soc.*, 52, 434 (2008)
7. A.A. El-Shfei, S.A. Abd El-Maksoud, and A.S. Fouda, "The role of indole and its derivatives in the pitting corrosion of Al in neutral chloride solution", *Corros. Sci.*, 46, 579 (2004).
8. Badawy, W. A.; Ismail, K. M.; Fathi, A. M. *Electrochim. Acta*, 51, 4182 (2006)
9. Ismail, K. M. *Electrochim. Acta*, 52, 7819 (2007)
10. Atkins, P. W. *Physical chemistry* 4th Ed. Oxford University Press, Oxford, 1993, 885.

## 비천연 아미노산 인입 확인을 위한 보고자 벡터 시스템 제작<sup>1</sup>

이단 다우드 살림, 박중찬<sup>2</sup>

대장균에서 orthogonal suppressor tRNA 와 aminoacyl-tRNA synthetase(ARS)를 활용하여 단백질의 특정위치에 비천연 아미노산을 인입하는 기술이 개발되었다. 이를 실험적으로 확인하기 위해 suppressor tRNA 인  $tRNA_2^{fMet}$ ,  $trnfMT2:A71/T35A36/G72$  (*fMam* tRNA)와 *Saccharomyces cerevisiae* TyrRS 를 함께 발현하는 플라스미드 벡터와 비천연 아미노산 인입을 확인할 수 있는 보고자 벡터 pGST $_{am}$  을 제작하였다. 최소배지인 GMMML 배지에서 amber suppression 유무에 따른 glutathione S transferase (GST)의 발현은 대장균 균주 DH10B 보다 BL21 에서 잘 나타났다. BL21 균주에서 비천연 아미노산 *o*-methyl-*L*-tyrosine 을 인입하는 ARS 에 의해 amber suppression 이 되었을 때 GST가 발현되는 것을 SDS-PAGE 분석을 통하여 확인하였다.

## 서론

세균, 효모 또는 포유동물 세포에서 숙주의 endogenous tRNA/ARS 에 의해서는 영향을 받지 않는 orthogonal suppressor tRNA 와 aminoacyl-tRNA synthetase (ARS) 짝이 사용하여 단백질의 특정위치에 새로운 작용기를 가지고 있는 비천연 아미노산을 삽입하는 기술이 개발되었다 (1). 특히 대장균에서 고대박테리아 (Archeae) *Methanococcus jannaschii* (*Mj*) TyrRS/tRNA<sup>Tyr</sup> 짝은 매우 효과적인 orthogonal 짝으로 활용되어 30 여종 이상의 비천연 아미노산을 삽입하는 기술이 보고되었다 (2-5). 또 다른 orthogonal suppressor tRNA/ARS 짝으로 *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) TyrRS 와 *E. coli* 의 initiator tRNA 를 돌연변이한  $tRNA_2^{fMet}$ ,  $trnfMT2:A71/T35A36/G72$  (*fMam* tRNA) 짝이 이용가능하다 (6). 우리는 앞서 *Sc* TyrRS 라이브러리를 제작하였으며 (7), 양성 및

<sup>1</sup> 이 논문은 2012학년도 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

<sup>2</sup> 한국외국어대학교 자연과학대학 생명공학과 교수

음성선별 시스템을 활용하여 비천연 아미노산 o-Methyl-L-tyrosine(MeTyr)을 삽입하는 TyrRS 돌연변이를 탐색하였다. 탐색된 MeTyrRS 의 단백질 내에 MeTyr 의 인입을 확인하기 위하여 보고자 플라스미드와 TyrRS 와 *fMam* tRNA 를 함께 발현할 수 있는 플라스미드 벡터의 제작이 필요하다. 본 논문은 보고자 플라스미드로 glutathione S-transferase (GST)의 57 번 잔기를 amber 코돈으로 돌연변이시킨 pGSTam 과 *Sc* TyrRS 와 *fMam* tRNA 를 함께 발현하는 pACamG-TyrRS 벡터를 제작하였다.

## 실험재료 및 방법

### 균주배양 및 Oligonucleotides

본 연구에 사용된 대장균 DH5<sup>+</sup>, DH10B, BL21는 LB 액상 혹은 고형배지에서 배양하였다. *Sc* TyrRS 발현벡터 pKK-TyrRS는 ampicillin 저항성 유전자를, *fMam* tRNA 발현벡터 pACamG는 tetracycline 저항성 유전자를 가지고 있으며, 이들 벡터가 형질전환된 대장균은 배지에 100 µg/ml ampicillin 및 25 µg/ml tetracycline을 첨가하였다. 사용된 oligonucleotides는 바이오니아사 (한국)에서 주문 제작하였다 (Table 1).

### pACamG-TyrRS 벡터 제작

단백질 내에 비천연 아미노산의 인입을 확인하기 위해 *fMam*tRNA와 *Sc* TyrRS와 MeTyrRS를 발현하는 벡터 pACamG-TyrRS, pACamG-MeTyrRS(1), pACamG-MeTyrRS(2)를 제작하였다. *fMam*tRNA와 ARS를 함께 발현하는 벡터를 제작하기 위해 CATamber 유전자와 *fMam*tRNA를 발현하는 pACamG 벡터를 *Pst*I 로 자른 후, T4 DNA polymerase를 처리하여 blunt end를 만들었다. T4 DNA ligase를 처리하여 self-ligation을 수행하여 DH5 $\alpha$ 에 형질전환하여 *Pst*I site가 제거된 clone을 선별하였다. pQE30으로부터 lac promoter와 multiple

cloning site (MCS)를 PQE-F와 PQE-R primers를 이용하여 PCR로 증폭하여 *PvuI/XmnI*을 이용하여 *PstI* site가 제거된 pACamG 에 도입하였다. 도입된 MCS의 *SacI/PstI*을 이용하여 PCR로 증폭한 wt TyrRS, MeTyrRS(1), MeTyrRS(2) 유전자를 subcloning 하여 pACamG-TyrRS, pACamG-MeTyrRS(1), pACamG-MeTyrRS(2)를 각각 제작하였다.

### **pGSTam 벡터제작**

단백질 내에 비천연 아미노산의 삽입을 확인하기 위한 보고자 벡터제작을 위해 pGEX-4T3를 이용하여 Glutathione S Transferase (GST) 유전자의 57번 잔기를 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 amber codon으로 치환하였다. 돌연변이를 위해 사용된 primers, GSTam-F와 GSTam-R의 서열은 Table 1에 있으며, site-directed mutagenesis는 QuickChange site-directed mutagenesis kit (Promega)를 사용하여 제조사 방법에 의해 수행하였다. 57번 잔기의 amber codon 삽입은 염기서열분석을 통해 확인하였다. 단백질분리를 위하여 GST 유전자 C-말단에 6개 His 잔기를 tagging하기 위해 우선 6개의 His 잔기를 암호화하는 염기서열을 갖는 2개의 상보적인 oligonucleotides를 합성하였다. 6xHis-F와 -R을 같은 molar ratio로 혼합하여 85°C 까지 가열한 후, 1시간에 걸쳐 상온까지 서서히 냉각시켰다. GSTam 유전자를 가진 pGEX-4T3를 *EcoRI*과 *NotI*을 이용하여 annealing된 DNA 절편을 subcloning하여 pGSTam 벡터를 제작하였다.

### **GSTam 유전자의 발현확인 및 비천연 아미노산 삽입확인**

pGSTam 벡터가 amber suppression 유무에 따라 발현되는 정도를 관찰하기 위해 DH10B와 BL21 균주에 형질전환하였다. 양성클론을 LB배지에서 배양한 후, IPTG로 3시간 37°C에서 induction한 후, 1 ml의 세포를 원심분리로 채취하였다. 세포에 100µl SDS-PAGE sample loading buffer를 넣고 10분간 가열하여 세포를 파괴하고 30 µl를 12% SDS-PAGE 젤에서 전기영동하여 염색하여 관찰하였다. 비천연 아미노산의 인입 확인은 pGSTam과 pACamG-TyrRS,

pACamG-MeTyrRS(1), 또는 pACamG-MeTyrRS(2)를 함께 형질전환한 후, 1 mM MeTyr가 있거나 없는 GMML 배지에서 GSTam 유전자를 IPTG induction 후에 GST 생산 유무를 SDS-PAGE 방법을 이용하여 확인하였다.

Table 1. Nucleotide sequences of primers that were used for plasmid construction

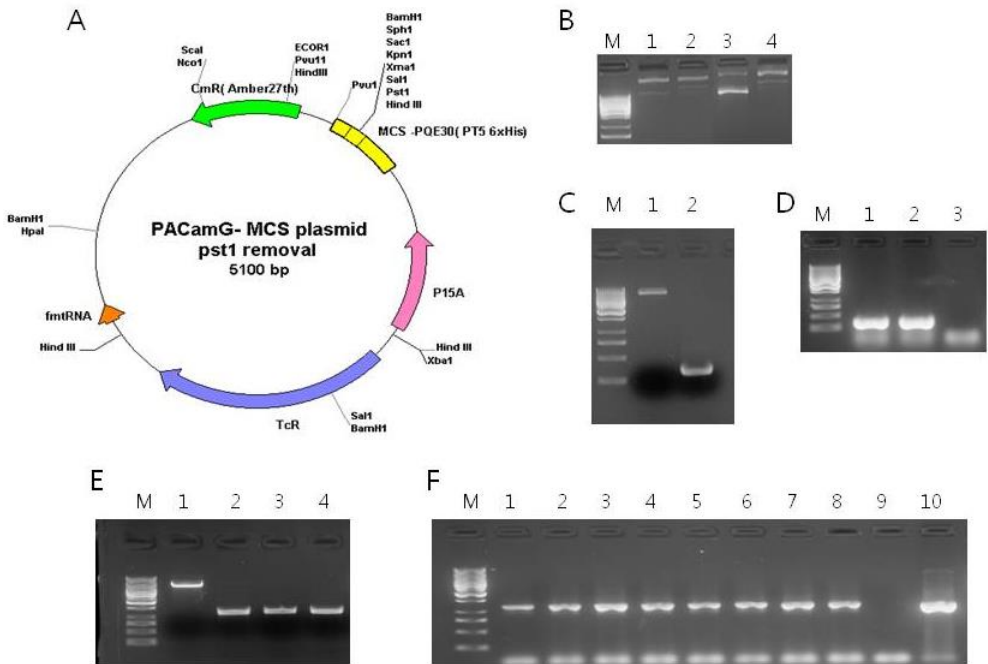
Primers	Nucleotide Sequences
PQE-F	5' - CATTACGATCGAAATCATAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGC-3'
PQE-R	5' - GTCCTGAAAATCTCGCCAAGCTAGC-3'
JP-1N	5' - CATTAGAGCTCATGTCTCTGCTGCCACGGTTGACCC-3' (SacI)
JP-2N	5' - AAAAAGTGCAGTTACAATTGGTTTCCTCTAG-3' (PstI)
6xHis-F	5' - AATTC <del>CC</del> CATCACCATCACCATCACTAA-3' (EcoRI)
6xHis-R	5' - GGCCTTAGTGATGGTGGTGGTGGTGG-3' (NotI)
GSTam-F	5' - GAATTGGGTTTGGAGTAGCCCAATCTTCCTT-3'
GSTam-R	5' - AAGGAAGATTGGGCTACTCCAACCCAATTC-3'

## 결과 및 고찰

### pACamG-TyrRS 벡터 제작

*fMam*tRNA와 ARS를 함께 발현하는 벡터를 제작하기 위해 CATamber 유전자와 *fMam*tRNA를 발현하는 pACamG 벡터에 pQE30으로부터 lac promoter와 multiple cloning site (MCS)를 PCR로 증폭하여 도입하였으며, 도입된 MCS의 *SacI/PstI*을 이용하여 PCR로 증폭한 wt TyrRS, MeTyrRS(1), MeTyrRS(2) 유전자를 cloning 하여 pACamG-TyrRS, pACamG-MeTyrRS(1), pACamG-MeTyrRS(2)를 각각 제작하였다 (Fig.1). pACamG에서 *PstI* site를 실험방법 및 재료에서와 같이 제거한 후, 양성클론으로부터 플라스미드를 분리하여 *PstI* digestion을 수행한 결과 원래의 pACamG는 잘렸으나 양성클론은 잘리지 않았다 (Fig. 1B). pQE30의 lac promoter와 MCS를 PCR로 증폭하였으며 (panel C), 이를 *PstI* site가 제거된 pACamG에 도입한 후, 양성클론을 골라 colony PCR을

통해 lac promoter-MCS의 subcloning을 확인하였다 (panel D). 여기에 wt TyrRS, MeTyrRS(1), MeTyrRS(2) 유전자를 PCR로 증폭하여 (panel E) SacI/PstI을 이용하여 cloning 하였다. 양성클론을 선별하여 colony PCR을 통해 insert의 삽입을 확인하였다 (panel F).

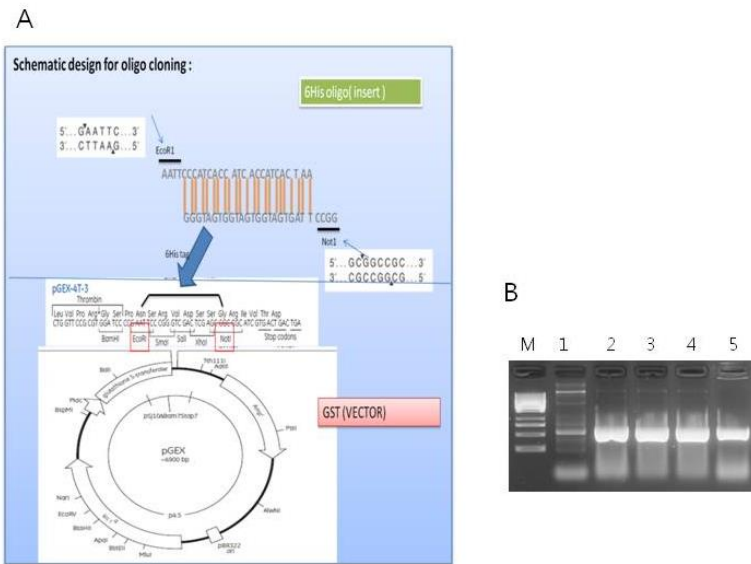


**Fig. 1.** *fMant*RNA와 ARS를 함께 발현하는 pACamG-ARS 벡터 제작. (A) pACamG-ARS 벡터 지도 (B) pACamG에서 *PstI* site 제거 확인. lane 1: pACamG uncut, 2: pACamG- $\Delta$ PstI uncut, 3: pACamG PstI cut, 4: pACamG- $\Delta$ PstI PstI cut. (C) pACamG PuvI/XmnI cut (lane1)과 lac promoter-MCS PCR 산물 (lane2). (D) insert PCR을 통한 lac promoter-MCS cloning 확인. lane 1,2: 2개의 선별 clones, lane 3: pACamG. (E) pACamG-MCS (lane 1) 및 wt TyrRS, MeTyrRS(1), MeTyrRS(2) 유전자의 PCR 산물 (lane 2, 3, 4). TyrRS PCR에 사용된 primer 염기서열이 표시되어 있음. (F) insert PCR을 통한 pACamG-ARS 클론 확인. lane 1,2: pACamG-TyrRS 양성클론 1,2, lane 3,4: pACamG-

MeTyrRS(1) 양성클론 1,2, lane 5~8: pACamG-MeTyrRS(2) 양성클론 1~4, lane 9: pACamG-MCS, lane 10: pKK-TyrRS

**pGSTam 벡터제작 및 발현검사**

보고자 벡터제작을 위해 pGEX-4T3를 이용하여 GST 유전자의 57번 잔기를 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 amber codon으로 치환하였으며, 염기서열 분석을 통해 이를 확인하였다. Amber suppression에 의해 발현되는 GST 단백질분리를 위하여 GST 유전자 C-말단에 6개 His 잔기를 encoding 하는 oligonucleotide를 합성하여 complementary strands를 annealing 한 후, pGEX-4T3 MCS의 *EcoRI/NotI*을 이용하여 cloning 하여 pGSTam 벡터를 제작하였다. 양성클론 4개를 무작위적으로 골라 GST 유전자 57번 잔기에 amber codon을 넣기 위해 제작된 primer와 6xHis를 coding 하는 primer를 활용하여 colony PCR을 수행하여 cloning 여부를 확인하였다 (Fig 3B).

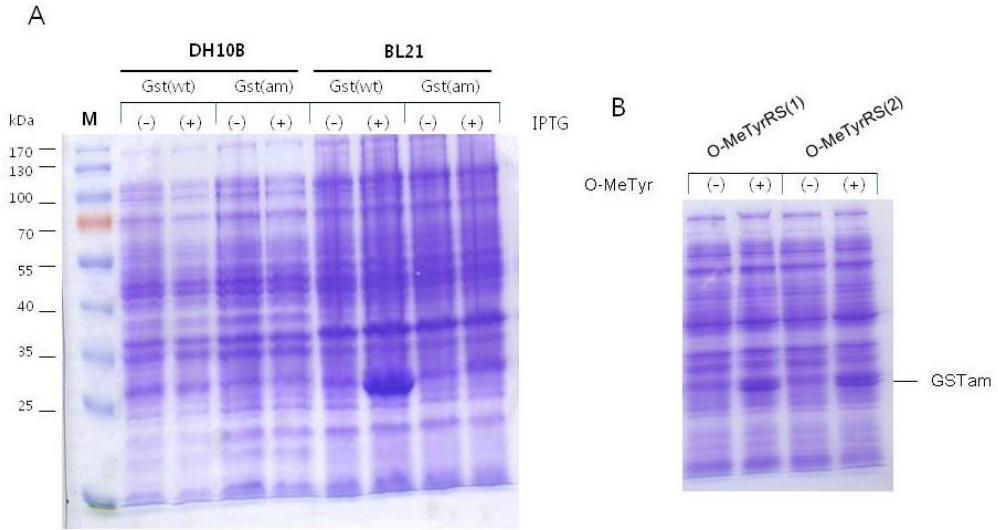




**Fig. 2. pGSTam 벡터 제작.** (A) pGEX-4T3에 6xHis을 삽입하기 위한 cloning 모식도. (B) insert PCR에 의한 6xHis cloning 확인. lane 1: pGEX-4T3, lane 2~5: 4개의 양성클론.

GMML 배지에서 pGSTam 의 GST 발현이 실제로 나타나지 않는지를 확인하기 위해 pGEX-4T3 (wtGST)와 pGSTam을 각각 DH10B 와 BL21 에 형질전환한 후, GMML 배지에서 IPTG induction 유무에 따른 GST 발현 유무를 SDS-PAGE 분석으로 조사하였다. 그 결과 DH10B 에서는 pGEX-4T3 (wtGST)도 발현이 되지 않았으며, BL21의 경우는 IPTG induction 시 pGEX-4T3 (wtGST)만 발현되고 pGSTam은 발현되지 않는 것으로 보아 BL21 strain을 이용하여 단백질 내의 비천연 아미노산 인입을 확인할 수 있을 것으로 판단되었다 (Fig. 3A).

pGSTam 을 이용한 비천연 아미노산 삽입확인을 위해 앞서 선별한 MeTyrRS 가 o-MeTyr을 단백질 내에 삽입하는 지를 확인하였다. BL21 대장균에 pGSTam과 pACamG-MeTyrRS(1) 또는 pACamG-MeTyrRS(2)를 함께 형질전환한 후, o-MeTyr가 있거나 없는 GMML 배지에서 GSTam 유전자를 IPTG induction 후에 GST 생산 유무를 SDS-PAGE 방법을 이용하여 확인하였다. 그 결과 2개의 MeTyrRS 클론 모두가 o-MeTyr이 있을 때에만 GST 단백질을 생산하였다 (Fig 3B). 이런 결과들은 pGSTam 보고자 벡터가 다양한 비천연 아미노산의 인입을 확인하는데 활용될 수 있음을 나타낸다.



**Fig. 3. SDS-PAGE 분석을 이용한 GST 발현 확인.** (A) GMML 배지에서 amber suppression에 의한 GST 발현실험을 위한 strain 검사. (B) GMML 배지 내에 o-MeTyr 유무에 따른 GST 발현.

### Acknowledgements

이 연구는 2012년 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

### 참고문헌

- [1] Liu, C.C. and Schultz, P.G. (2010) Adding new chemistries to the genetic code. *Annu. Rev. Biochem.* 79:413-444
- [2] Wang, L., Brock, A., Herberich, B., and Schultz, P.G. (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* 292:498-500
- [3] Tsao, M.L., Summerer, D., Ryu, Y., and Schultz, P.G. (2006) The genetic incorporation of a distance probe into proteins in *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* 128:4572-4573
- [4] Liu, H., Wang, L., Brock, A., Wong, C.H., and Schultz, P.G. (2003) A method for the generation of glycoprotein mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* 125:1702-1703
- [5] Wang, L., Xie, J., and Schultz, P.G. (2006) Expanding the genetic code. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35:225-249

[6] Chow, C.M. and RajBhandary, U.L. (1993) *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase gene. *J. Biol. Chem.* 268: 12855-12863.

[7] 다우드 이단 살림, 박중찬. (2011) 비천연 아미노산 삽입을 위한 *Saccharomyces cerevisiae* Tyrosyl-tRNA synthetase 돌연변이 라이브러리 제작. *기초과학연구*, 32:57-66

제 34집

발행인 소장 유세기

운영위원 김승욱 이석주 김해조 박영훈 최대우

인쇄처 계명프린팅

발행소 한국외국어대학교 기초과학연구소

주소 경기도 용인시 처인구 모현면 왕산리 산 89 449-791